

## *ÉCOLE DOCTORALE SST*

**Laboratoire Nutrition, Croissance, Cancer INSERM U921**

# THÈSE

présentée par :

**Alban GIRAULT**

Soutenue le : 24 juin 2011

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

## **Inhibition du canal SK3 et du développement de métastases par un éther-lipide synthétique**

### **THÈSE dirigée par :**

**M. VANDIER Christophe**

Professeur des Universités, Université François – Rabelais Tours

### **RAPPORTEURS :**

**M. DUPRAT Fabrice**

Chargé de Recherche INSERM, HDR, Nice

**M. RECORD Michel**

Directeur de Recherche INSERM, HDR, Toulouse

---

### **JURY :**

**M. BOUGNOUX Philippe**

Professeur des Universités, Université François – Rabelais Tours

**Mlle. CHANTOME Aurélie**

Ingénieur de Recherche, Université François – Rabelais Tours

**M. DUPRAT Fabrice**

Chargé de Recherche INSERM, Nice

**M. JAFFRES Paul-Alain**

Professeur des Universités, Université de Brest

**Mme. JOULIN Virginie**

Directeur de Recherche INSERM, Paris

**M. RECORD Michel**

Directeur de Recherche INSERM, Toulouse

**M. VANDIER Christophe**

Professeur des Universités, Université François – Rabelais Tours

**M. VERRECCHIA Franck**

Directeur de Recherche INSERM, Nantes

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire

« Nutrition, Croissance et Cancer », INSERM U921, Université François Rabelais Tours

Directeur : Pr. P. Bougnoux



Cette thèse a été financée par la Région Centre et par l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC)



## Remerciements

*La thèse est une aventure que l'on ne fait qu'une fois. Pour réaliser ce périple, j'ai eu la chance d'intégrer une équipe qui au cours du temps devient beaucoup plus qu'un groupe de collègues. L'ensemble des membres du N2C devient une seconde famille avec qui l'on a envie de passer beaucoup de temps et qui est toujours là pour les coups durs mais également pour profiter des meilleurs moments. C'est pour cela que la rédaction des remerciements est une étape laborieuse car malgré la richesse de la langue française, elle ne comporte pas de mots assez forts pour remercier à sa juste valeur l'ensemble des amis que l'on croise tous les jours au laboratoire. J'essaierai donc avec les mots dont je dispose de le faire le mieux possible.*

Je remercie le professeur Philippe Bougnoux de m'avoir accueilli au sein du laboratoire Nutrition, Croissance et Cancer et ceci depuis mon stage de licence. Merci également d'avoir accepté de participer à mon jury.

Je remercie également Mr Michel Record et Mr Fabrice Duprat d'avoir accepté d'être rapporteurs et d'avoir pris de leur temps pour évaluer mon travail.

Merci également à Mme Virginie Joulin, Mr Franck Verrecchia et Mr Paul-Alain Jaffrès de prendre part à mon jury et d'évaluer mon travail.

Christophe, merci pour la confiance que tu m'as donnée depuis le stage de licence et de m'avoir encadré tout au long de mon cursus. En plus de la part scientifique, ton humour, ton enthousiasme et ton optimisme permanent permettent au « team SK3 » d'avancer et de progresser en permanence. Merci pour tout...

Aurélie (maintenant que je ne peux plus utiliser mamy, je dirai Orl comme tout le monde) et Marie, tandem de choc pour un encadrement du tonnerre. De l'aliquotage (merci Marie, mon pousse s'en souvient encore) à l'amplification du plasmide, apprendre avec vous a été une très grande chance pour moi. Merci pour tous vos conseils, vos trucs et astuces, ils me serviront pendant très longtemps.

Pierre, « Mr homéopathie », « Mr nom des plantes en latin », « Mr lipides », je ne sais pas avec combien de catégories on pourrait continuer ce jeu. L'une des phrases que tu entends le

plus souvent est sûrement : « Pierre, je peux te demander quelque chose ? ». Merci pour ta patience, tous tes conseils et tout ce que tu nous apportes tous les jours et surtout tard le soir. Dernière chose, avec Christophe, vous êtes l'âme de « l'humour bureau 4 ». Ne changez jamais ça !

Dernière arrivée dans le bureau 4, Lucie C. (« boulette » pour les intimes). Merci de ta bonne humeur et de tes réflexions. Pour les histoires drôles, tu as trouvé ton repère à nos côtés dans ce bureau. Surtout gardes l'esprit grosse mite, c'est « cool » comme ça.

Ludo, Lucie B., Romain, Tran, collègues et compères, merci pour tous les coups de main et pour toutes les bêtises. Ces moments passés me sont très chers et vont énormément me manquer.

A tous les autres thésards et stagiaires (présents et passés, je ne peux pas tous vous citer, excusez moi, on en voit passer du monde au N2C) : Stéphanie, Ramez, Billel, Virginie, Sophie K., Sophie V., Mimsy, Aurélia, Emeline B., Maxime... Merci pour les bons moments que nous avons passé et conservez la bonne ambiance qui caractérise cette équipe.

A tous les autres membres du N2C, merci pour les discussions scientifiques ou non, les conseils, les repas du midi animés, les moments de folies. Comme l'a dit un grand sage (respect grand sensei Seb), un jour il faut quitter le nid. Cette étape va être difficile, vous me manquerez tous. Une spéciale dédicace, à Catherine (Caticate), Isa, Amandine, Emeline M., sans vous le labo ne serait pas le même et ça ne marcherait pas aussi bien.

A mes amis, si par hasard un jour vous lisiez ces pages, je sais quand je vous parle de mon sujet de thèse, je vous parle chinois mais je vous remercie pour le soutien de tous les instants que vous m'avez apportés et tous les moments de détente que l'on a passé ensemble à l'AOC et à la Villo durant ces dernières années.

A mes parents, sans qui une aventure comme cette thèse n'aurait pu se dérouler comme cela s'est passé. Merci pour votre soutien sans faille.

## Résumé

Le cancer est un problème de santé publique majeur dans le monde. En 2008, plus de 12 millions de nouveaux cas ont été détectés et le cancer a provoqué le décès de près de 7,5 millions de personnes. Parmi les cancers les plus fréquents, le cancer du sein, le cancer de la prostate, le cancer du poumon sont des cancers qui provoquent souvent l'apparition de tumeurs secondaires appelées également métastases. A l'heure actuelle, la majorité des traitements appliqués au cancer s'attachent à supprimer ou à ralentir l'évolution de la tumeur primaire. Les cliniciens ont peu d'outils leur permettant de lutter contre l'apparition et la formation des métastases. Les opportunités ouvertes par la découverte de nouvelles cibles impliquées dans le développement des métastases et de nouveaux composés bloquant ces cibles seront importantes pour l'amélioration des soins de patients atteints de cancer.

Au laboratoire, il a été mis en évidence que le canal SK3, un canal potassique de petite conductance activé par le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, était impliqué dans la migration de cellules cancéreuses mammaires très métastasiées, les cellules MDA-MB-435s. La migration cellulaire est une propriété fondamentale des cellules cancéreuses qui leur permet de former les métastases. La mise en évidence de composés inhibant la migration dépendante du canal SK3 pourrait permettre le développement de nouvelles molécules adaptées au traitement ou à la prévention des métastases.

L'un des centres d'intérêt de l'équipe Nutrition, Croissance, Cancer (INSERM U921) est de comprendre comment des lipides alimentaires et d'origine marine préviennent la récurrence métastatique. Parmi les lipides d'origine marine, il a été montré que les éther-lipides extraits de l'huile de foie de requin possédaient des propriétés anticancéreuses ainsi que des propriétés immunostimulantes. L'édelfosine (1-O-Octadécyl-2-O-Méthyl-*sn*-Glycéro-Phosphocholine), un composé synthétique dérivé des éther-lipides d'origine marine, présente des propriétés anticancéreuses intéressantes *in vitro* mais lors de son utilisation en clinique, ce composé a provoqué différents effets secondaires tels qu'une hémolyse, des troubles gastro-intestinaux, une hépatotoxicité. Nous avons montré que le canal SK3 est une cible de l'édelfosine et l'objectif de ma thèse a été de réaliser une étude de la relation entre la structure et l'activité de l'édelfosine afin de déterminer les parties structurales de l'édelfosine essentielles à l'inhibition du canal SK3 et de la migration. Cette étude nous a également permis de sélectionner des analogues de l'édelfosine présentant des propriétés inhibitrices équivalentes à l'édelfosine mais présentant une toxicité moindre pour les cellules non cancéreuses. Après

avoir décrit les parties structurales nécessaires à l'activité de l'édelfosine, nous avons sélectionné l'Ohmline (1-O-Hexadécyl-2-O-Méthyl-*sn*-glycéro-Lactose). Cet éther-lipide est différent de l'édelfosine au niveau du *sn*-3 du squelette glycérol. L'Ohmline possède un groupement lactose en substitution de la phosphocholine de l'édelfosine. Il inhibe la migration dépendante du canal SK3 des cellules cancéreuses sans affecter la migration et la viabilité de cellules non cancéreuses. Par ailleurs, sa sélectivité vis à vis des KCa est innovante. Il inhibe SK3 et dans une moindre mesure SK1. Il n'a aucun effet sur le canal SK2 ni sur le canal IKCa. L'inhibition du canal SK3 par l'Ohmline est dépendante de la concentration appliquée et du temps. L'Ohmline possède un carbone asymétrique dans sa structure, ce qui entraîne l'existence de deux stéréoisomères. L'inhibition du canal SK3 n'est pas stéréospécifique, les deux isomères possèdent le même pouvoir inhibiteur. D'autre part, l'Ohmline n'a aucun effet sur les protéines kinases C ou sur le récepteur au PAF comme cela a été décrit pour l'édelfosine. Nous avons également évalué l'effet d'une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. L'utilisation de A23187, un ionophore calcique, permet, en augmentant la concentration calcique intracellulaire de restaurer l'activité du canal après l'inhibition par l'Ohmline. Ceci suggère que le mécanisme d'action de l'Ohmline pourrait modifier la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  du canal. L'Ohmline est un inhibiteur lipidique du canal SK3 qui possède une structure différente des inhibiteurs actuellement connus du canal SK3 et des canaux KCa en général.

Nous avons par la suite étudié l'effet de l'Ohmline dans le développement tumoral et en particulier dans le développement de la tumeur primaire et des métastases. Pour cela nous avons développé deux modèles chez la souris immunodéficiente : (i) un modèle de métastases expérimentales qui consiste à injecter des cellules cancéreuses mammaires, exprimant le gène de la luciférase ce qui permet un suivi par bioluminescence, au niveau de la veine caudale des souris ; nous suivons alors le développement des métastases sans qu'une tumeur primaire ne soit présente et (ii) un modèle de xénogreffe orthotopique dans lequel les cellules sont implantées dans le bourgeon mammaire en formation de la souris ; ce second modèle permet de suivre le développement de la tumeur primaire et par la suite le développement de métastases formées par des cellules qui se sont échappées de la tumeur primaire. Dans le modèle de xénogreffe orthotopique, nous avons observé que l'Ohmline diminuait la fréquence des métastases sans affecter la tumeur primaire. Quel que soit le modèle utilisé, l'Ohmline inhibe l'apparition des métastases pulmonaires et osseuses. Ce dernier résultat est surprenant car nous n'avons pas observé d'effet sur les métastases pulmonaires lors de la comparaison

de cellules SK3+ et de cellules SK3-. Ces éléments suggèrent que l'Ohmline pourrait affecter la formation des métastases par d'autres cibles (non encore déterminées) autres que SK3.

Ce travail de thèse a permis de sélectionner l'Ohmline, un éther-lipide synthétique analogue de l'édelfosine, inhibant une cible originale (le canal SK3) dans le cancer et qui possède une activité anti-métastatique. Ce composé prometteur pourrait devenir le premier membre d'une famille de molécules lipidiques inhibitrices de métastases.

Mots-clés : éther-lipides, canal SK3, cellules cancéreuses mammaires, migration cellulaire, métastases.

## Résumé en anglais

Cancer is a major public health problem. In 2008, more than 12 millions of new cases were discovered and cancer caused about 7.5 million deaths. Among most common cancer, breast cancer, prostate cancer and lung cancer are ones that provoke metastasis. Currently, the major part of cancer treatment strategies were targeting against primary tumor. Physicians have few compounds to fight against metastasis development. Discovery of new target in metastasis development or new compounds to fight metastasis will be great progress for patients suffering of with cancers.

In the lab, the SK3 channel, a small conductance calcium-activated potassium channel, was shown to be involved in motility of a high metastatic breast cancer cell line, MDA-MB-435s cells. Cell motility is a major property of cells able to form metastasis. Highlighting new compounds that inhibit the SK3 dependent migration should allow to develop new compound directed against metastasis or to prevent their development.

Understand how dietary lipids and marine lipids prevent metastatic recurrence is one major interest of “Nutrition, Croissance, Cancer” lab (INSERM U921). Through this lipid class, it has been shown that ether lipids from liver shark oil have anti cancerous and immunostimulant properties. Edelfosine (1-O-Octadécyl-2-O-Méthyl-*sn*-Glycéro-Phosphocholine), a synthetic compound derived from marine lipids, has high anti cancerous potential *in vitro* but clinical use provoked some side effects such as hemolysis, hepatotoxicity and gastrointestinal toxicity. We shown that SK3 is an edelfosine target and the aim of my PhD was to determine which structural parts of this compound have a key role for its SK3 channel and cell motility inhibition. During this work, we selected edelfosine’s analogues with similar inhibitory properties but without toxicity on non-cancerous cells. After the description of necessary parts of edelfosine, we selected Ohmlin (1-O-Hexadécyl-2-O-Méthyl-*sn*-glycéro-Lactose). This ether lipid is modified on *sn*-3 position of glycerol compared to edelfosine. Ohmlin has a lactose group in substitution of phosphocholine group. This compound inhibits SK3 dependent motility of cancerous cells without effect on motility and viability of non-cancerous cells. In addition its selectivity for SKCa channels is original. Ohmlin inhibits SK3>SK1 and it has no effect on SK2 and IKCa. SK3 inhibition is time and dose dependent. Ohmlin has an asymmetric carbon in its structure that give two stereoisomers. SK3 inhibition is not stereospecific. However, Ohmlin has no effect on PKC or PAF receptor as it described for edelfosine. We also evaluated the effect of an increase of

intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Using A23187, a  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore that increases intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, we restored SK3 activity after Ohmlin inhibition. These results suggest that Ohmlin affects  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of SK3 channel. Ohmlin is structurally different from other KCa channels inhibitors already known.

After, we studied Ohmlin effects on tumor development: primary tumor growth and metastasis development. In order to test these activities we developed two nude mice models. The first one is a model of experimental metastasis consisting in an injection of cancerous cells expressing luciferase in the tail vein of nude mice. Luciferase tagged-cells allows to follow them *in vivo* and to observe development without primary tumor formation. The second model is an orthotopic xenograft of breast cancer cells in the fat pad. This one allows us to observe the primary tumor development and later the growth of metastasis by cells that escaped from primary tumor. In the orthotopic xenograft model, we showed that Ohmlin had no effect on primary tumor but decreased metastatic profile. Whatever the model used, Ohmlin decreased lung and bone metastasis. Those last results are surprising because we did not observe any effect of SK3 on lung metastasis. This information suggests that Ohmlin should affect metastasis development through other unspecified targets than SK3.

This work brought to light Ohmlin, a synthetic ether lipid analogue of edelfosine, that inhibits an original target in cancer (SK3 channel) and has anti metastatic properties. This promising compound should become the first member of a family of lipid inhibitor of metastasis.

Key words: ether lipid, SK3 channel, breast cancer cells, cell migration, metastasis.

# Table des matières

Remerciements .....	3
Résumé .....	5
Résumé en anglais .....	8
Table des matières .....	10
Liste des abréviations .....	14
Liste des tableaux .....	15
Liste des figures .....	16
Liste des publications .....	20
<b>Introduction</b> .....	21
<b>Historique et état actuel des connaissances</b> .....	24
I. Le cancer : généralités et métastases .....	25
A. Généralités .....	25
B. Biologie de la cellule cancéreuse .....	27
1. Le développement du cancer .....	27
2. La cellule cancéreuse .....	29
C. Migration et métastases .....	30
1. La migration cellulaire .....	31
2. Les métastases .....	37
II. Rôles des canaux potassiques dans le cancer : implication des canaux KCa .....	46
A. Les canaux ioniques : généralités .....	46
1. Introduction .....	46
2. Classification des canaux ioniques .....	46
3. Sélectivité des canaux ioniques .....	47
4. Les canaux potassiques .....	48
B. Les canaux KCa .....	49
1. Historique des canaux SKCa .....	50
2. Gènes, structures et propriétés électrophysiologiques des canaux SKCa .....	51
3. Canaux SKCa et sensibilité au calcium .....	63
4. Régulation des canaux SKCa .....	67
5. Pharmacologie des canaux SKCa .....	72
6. Le canal IKCa, historique et généralités .....	76
7. Propriétés électrophysiologiques du canal IKCa .....	77



8. Pharmacologie et régulation du canal IKCa.....	77
C. Rôles physio-pathologiques des KCa.....	80
1. Rôles des SKCa dans les conditions physiologiques .....	81
2. Rôles des SKCa dans les pathologies autres que le cancer .....	85
3. Rôles de IKCa dans les conditions physiologiques.....	87
4. Rôles du IKCa dans les pathologies autres que le cancer .....	90
5. Rôles des canaux KCa dans le cancer .....	91
III. Rôles des éther-lipides dans le cancer : modulateurs du transportome.....	97
A. Généralités.....	97
B. Les éther-lipides naturels.....	99
1. Origine et métabolisme des éther-lipides naturels .....	100
2. Rôles physiopathologiques des éther-lipides naturels.....	103
C. Les éther-lipides anticancéreux synthétiques .....	106
1. Mise en évidence des effets anticancéreux et utilisation d'éther-lipides synthétiques .....	106
2. Mécanismes d'actions .....	107
3. L'édelfosine.....	109
4. Evolution des APL vers les phospholipides glycosylés .....	115
<b>Objectifs de la thèse</b> .....	117
<b>Méthodologie</b> .....	119
I. La culture cellulaire .....	120
A. Lignées cellulaires utilisées.....	120
1. Les cellules épithéliales mammaires cancéreuses et non cancéreuses .....	120
2. Autres lignées cellulaires développées et utilisées.....	120
3. Limites des cultures cellulaires .....	122
4. Solutions et plastiques utilisés en culture cellulaire.....	123
B. Protocoles de culture cellulaire.....	125
1. Décryogénisation et cryogénisation des cellules.....	125
2. Trypsination des cellules .....	125
3. Evaluation de la toxicité et prolifération cellulaire .....	125
4. Evaluation de la motilité cellulaire.....	126
5. Expériences de déplacements de ligands spécifiques et d'activation du récepteur au PAF.....	129

6. Mesures d'activités de la phospholipase C (PLC) et des protéines kinases C (PKCs)	130
7. Détermination du profil génotoxique	130
II. Biologie moléculaire	132
A. Transfection transitoire	132
1. Préparation des plasmides	132
2. Purification de l'ADN plasmidique	133
3. Transfection transitoire	133
III. Electrophysiologie cellulaire	135
1. Introduction	135
2. Les différentes configurations	135
3. L'installation de patch-clamp	137
4. Les pipettes de patch clamp	138
5. Solutions utilisées	139
6. Protocoles utilisés	141
7. Limites de la technique de patch clamp	142
IV. Expérimentation animale	143
A. Préparation des composés	143
B. Protocole d'évaluation de la toxicité	144
C. Modèle dit de métastases expérimentales et tests de molécules sur ce modèle	145
D. Modèle de xénogreffe orthotopique	145
E. Mesure de l'incorporation des molécules dans les tissus	147
F. Analyse des résultats <i>in vivo</i>	149
V. Analyses et statistiques	151
<b>Résultats et Discussion</b>	152
I. Le canal SK3 : une nouvelle cible des éther-lipides	153
A. Brefs rappels des effets cellulaires de l'édelfosine	153
B. Etude de la relation entre la structure et l'activité de l'édelfosine vis-à-vis du canal SK3 : sélection de l'Ohmline	155
1. Effets de l'édelfosine sur la viabilité cellulaire	155
2. Synthèse de nouveaux analogues de l'édelfosine et tests sur la migration cellulaire des MDA-MB-435s	156
3. Mécanisme d'action de l'Ohmline	164
C. Discussion	178

II. L'Ohmlin : une nouvelle molécule anti-métastatique.....	182
A. L'Ohmlin et l'édelfosine réduisent le développement des métastases .....	183
1. Etude de toxicité.....	183
2. Effets de l'Ohmlin et de l'édelfosine sur le développement tumoral .....	185
B. Mesure de l'incorporation de l'Ohmlin et de l'édelfosine.....	196
1. Mise au point de la mesure.....	196
2. Mesure de l'incorporation de l'Ohmlin et de l'édelfosine dans la tumeur primaire	199
3. Incorporation de l'Ohmlin et de l'édelfosine dans les tissus métastatiques .....	201
C. Discussion.....	202
<b>Conclusion</b> .....	207
Bibliographie .....	210
Résumé .....	233
Résumé en anglais .....	233

## Liste des abréviations

Ala : Alanine  
AP-1 : Activator Protein 1  
ARNm : Acide RiboNucléique messenger  
Asn : Asparagine  
ATCC : American Type Culture Collection  
ATP : Adénosine TriPhosphate  
BMSC : Bone Marrow Stem Cells  
CaM : Calmoduline  
CaMBD : Calmodulin Binding Domain  
ChTx : Charybdotoxine  
CXCL12 : C-X-C chemokine ligand 12  
CXCR4 : C-X-C chemokine receptor 4  
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole  
DMSO : Dimethylsulfoxyde  
EC<sub>50</sub> : Concentration pour obtenir 50 % de l'effet  
FGF : Fibroblast Growth Factor  
GFP : Green Fluorescent Protein  
HGNC : HUGO Gene Nomenclature Committee  
His : Histidine  
IC<sub>50</sub> : Concentration pour inhiber 50 % de l'effet  
IUPHAR : International Union of Basic and Clinical Pharmacology  
Kv : canal potassique dépendant du voltage  
LB : Lysogeny Broth  
LPA : Acide Lysophosphatidique  
MEC : Matrice ExtraCellulaire  
MLCK : Myosin Ligth Chain Kinase  
PAF : Platelet-Activating Factor  
P<sub>0</sub> : Probabilité d'ouverture  
SEM : Standard Error of the Mean (Erreur standard à la moyenne)  
SDF-1 : Stromal cell-Derived Factor-1  
shARN : short hairpin ARN  
SKCa : Small conductance calcium activated channel  
Sp : Specificity protein transcription factor  
SVF : Sérum de Veau Fœtal  
TEA : TetraEthylAmmonium  
TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse  
TM : segment transmembranaire  
TRP : Transient Receptor Potential  
Val : Valine  
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor  
v / v : volume à volume  
4-AP : 4-Aminopyridine

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1. Nomenclature des canaux KCa.</b> .....	51
<b>Tableau 2. Valeurs des IC<sub>50</sub> pour les inhibiteurs des SKCa et de IKCa.</b> .....	73
<b>Tableau 3. Valeurs des EC<sub>50</sub> pour les activateurs des canaux SKCa et IKCa.</b> .....	75
<b>Tableau 4. Lignées cellulaires utilisées.</b> .....	121
<b>Tableau 5. Composition de la solution extra cellulaire (PSS).</b> .....	140
<b>Tableau 6. Composition des milieux intra pipette (MIP) utilisés en fonction des lignées et des activités calciques.</b> .....	141
<b>Tableau 7. Correspondance entre les intensités BLI et le nombre de points attribués pour établir le score métastatique.</b> .....	150
<b>Tableau 8. Résultats de l'étude structure activité des analogues de l'édelfosine.</b> .....	158
<b>Tableau 9. Evaluation de la génotoxicité de l'Ohmline.</b> .....	177
<b>Tableau 10. Fréquences des métastases pulmonaires et osseuses dans les 3 groupes de souris.</b> .....	191
<b>Tableau 11. Fréquences des métastases pulmonaires et osseuses dans les différents groupes.</b> .....	196

## Liste des figures

<b>Figure 1. Incidence des cancers en 2005 en France métropolitaine.....</b>	<b>26</b>
<b>Figure 2. Etapes du développement cancéreux. ....</b>	<b>28</b>
<b>Figure 3. Modifications acquises par les cellules cancéreuses.....</b>	<b>30</b>
<b>Figure 4. Schéma de la migration cellulaire dans un environnement en 2 dimensions. ...</b>	<b>33</b>
<b>Figure 5. Schéma de la cascade métastatique. ....</b>	<b>38</b>
<b>Figure 6. Schéma du mouvement des cellules tumorales du site de la tumeur primaire au site métastatique. ....</b>	<b>41</b>
<b>Figure 7. Quatre groupes structuraux des canaux potassiques. ....</b>	<b>49</b>
<b>Figure 8. Arbre phylogénétique de la famille des canaux SKCa et IKCa.....</b>	<b>52</b>
<b>Figure 9. Expression tissulaire des ARNm codant pour les canaux SK1-3 et IKCa.....</b>	<b>53</b>
<b>Figure 10. Structure des canaux SKCa. ....</b>	<b>57</b>
<b>Figure 11. Complexe multiprotéique environnant de SK2.....</b>	<b>60</b>
<b>Figure 12. Exemple de courant SKCa et rectification entrante. ....</b>	<b>62</b>
<b>Figure 13. Site de fixation au calcium de la calmoduline. ....</b>	<b>64</b>
<b>Figure 14. Fixation de la calmoduline sur le domaine de fixation (CaMBD) de SK2 en présence de calcium.....</b>	<b>67</b>
<b>Figure 15. Modèle de mécanisme de transport du canal SK2.....</b>	<b>71</b>
<b>Figure 16. Structures des composés inhibiteurs et activateurs des canaux KCa. ....</b>	<b>74</b>
<b>Figure 17. Mécanisme de vasodilatation dépendant des canaux SKCa et IKCa.....</b>	<b>84</b>
<b>Figure 18. Implication du canal SK3 dans la motilité des cellules cancéreuses mammaires et de mélanomes. ....</b>	<b>94</b>
<b>Figure 19. Ether-lipides extraits de l'huile de foie d'élaémobranches. ....</b>	<b>98</b>
<b>Figure 20. Voie de biosynthèse des éther-lipides. ....</b>	<b>101</b>
<b>Figure 21. Voie de synthèse du PAF. ....</b>	<b>102</b>
<b>Figure 22. Structures du PAF, de l'édelfosine et de la miltéfosine. ....</b>	<b>107</b>
<b>Figure 23. Schéma présentant quelques voies affectées par les ALP. ....</b>	<b>108</b>
<b>Figure 24. Activités de l'édelfosine sur les MDA-MB-435s. ....</b>	<b>113</b>
<b>Figure 25. Système d'évaluation de la migration. ....</b>	<b>127</b>
<b>Figure 26. MDA-MB-435s sur la face inférieure de l'insert colorées à l'hématoxyline suite à une expérience de migration.....</b>	<b>128</b>
<b>Figure 27. MDA-MB-435s colorées au DAPI après migration puis dénombrées par le logiciel.....</b>	<b>128</b>

Figure 28. Protocole de transfection transitoire.....	134
Figure 29. Schéma des quatre configurations utilisables en patch clamp.....	136
Figure 30. Schéma de l'installation de patch clamp.....	138
Figure 31. Protocoles utilisés pour les expériences de patch clamp et exemples d'enregistrements.....	141
Figure 32. Protocole d'évaluation de la toxicité de composés <i>in vivo</i> . ....	144
Figure 33. Corrélation entre volume de la tumeur primaire et l'intensité de BLI pour les cellules MDA-MB-435s shRD (SK3+). ....	146
Figure 34. Protocoles utilisés pour les expérimentations animales.....	147
Figure 35. Exemple de courbe d'étalonnage obtenue pour l'Ohmline.....	149
Figure 36. Modèle proposé pour l'activité inhibitrice de l'édelfosine sur le canal SK3.....	154
Figure 37. Toxicité de l'édelfosine-C18 et de l'édelfosine-C16 sur les cellules épithéliales non cancéreuses et sur les cellules cancéreuses MDA-MB-435s. ....	155
Figure 38. Structure des composés utilisés lors de l'étude de relation entre la structure et l'activité de l'édelfosine.....	157
Figure 39. Effets de l'édelfosine-C16 sur les MDA-MB-435s et sur le courant SK3.....	159
Figure 40. Effets de l'Ohmline sur la viabilité cellulaire des cellules cancéreuses et normales. ....	164
Figure 41. Effets de l'Ohmline sur la migration des cellules cancéreuses et des cellules normales. ....	165
Figure 42. Effets de l'Ohmline sur la migration dépendante du canal SK3 des cellules cancéreuses MDA-MB-435s. ....	165
Figure 43. Effets de l'Ohmline sur le canal SK3 des MDA-MB-435s.....	166
Figure 44. Inhibition dépendante de la dose d'apamine du canal SK3 dans les cellules HEK-SK3. ....	167
Figure 45. Exemple de l'effet de l'Ohmline à 10 $\mu$ M en application aiguë sur les cellules HEK-SK3. ....	168
Figure 46. Effets de l'Ohmline sur l'amplitude du courant SK3 et sur la conductance membranaire.....	168
Figure 47. Inhibition du courant SK3 en fonction du temps et de la concentration d'Ohmline. ....	169
Figure 48. Effet de l'augmentation du $\text{Ca}^{2+}$ intracellulaire sur l'inhibition de l'Ohmline. ....	169
Figure 49. Effet de la stéréospécificité de l'Ohmline sur l'inhibition du canal SK3.....	170

Figure 50. Effet de l'Ohmline sur la fixation de l'apamine ( $^{125}\text{I}$ ).....	171
Figure 51. Courants représentatifs enregistrés dans les cellules HEK293 exprimant les différents canaux SKCa et IKCa avant et après applications de l'Ohmline. ....	172
Figure 52. Effets de l'Ohmline sur l'amplitude et la conductance des courants SK1, SK2, SK3 et IKCa.....	173
Figure 53. Effets de l'Ohmline sur la fixation des ligands spécifiques des canaux calciques de type L, hERG et canal sodique dépendant du voltage. ....	174
Figure 54. Effets de l'édelfosine et de l'Ohmline sur la fixation de l'acide lysophosphatidique à son récepteur.....	175
Figure 55. Effets de l'édelfosine et de l'Ohmline sur la fixation du PAF à son récepteur et sur l'activation de ce récepteur.....	176
Figure 56. Effets de l'Ohmline sur l'activité de la phospholipase C.....	176
Figure 57. Effets de l'Ohmline sur l'activité des 10 familles de PKCs.....	177
Figure 58. Evolution du poids des souris au cours de l'expérimentation de toxicité. ....	184
Figure 59. Illustration du suivi du développement de la tumeur primaire par bioluminescence.....	185
Figure 60. Evolution du poids des souris traitées ou non avec 15 mg/kg d'Ohmline et 15 mg/kg d'édelfosine dans le modèle de xénogreffe orthotopique. ....	186
Figure 61. Influence de l'Ohmline et de l'édelfosine sur le poids du foie et sur le poids du cœur. ....	187
Figure 62. Evolution du volume de la tumeur primaire des souris traitées ou non avec 15 mg/kg d'Ohmline ou 15 mg/kg d'édelfosine dans le modèle de xénogreffe orthotopique.....	188
Figure 63. Evolution de la BLI de la tumeur primaire des souris traitées ou non avec 15 mg/kg d'Ohmline ou d'édelfosine dans le modèle de xénogreffe orthotopique.....	188
Figure 64. Score métastatique des souris traitées ou non avec 15 mg/kg d'Ohmline ou 15 mg/kg d'édelfosine dans le modèle de xénogreffe orthotopique. ....	189
Figure 65. Score métastatique pulmonaire des souris traitées ou non avec 15 mg/kg d'Ohmline ou 15 mg/kg d'édelfosine dans le modèle de xénogreffe orthotopique. ....	190
Figure 66. Score métastatique osseux des souris traitées ou non avec 15 mg/kg d'Ohmline ou 15 mg/kg d'édelfosine dans le modèle de xénogreffe orthotopique.....	190
Figure 67. Suivi par bioluminescence de l'évolution de métastases dans une souris témoin.....	192
Figure 68. Evolution du poids des souris au cours de l'expérience. ....	192



<b>Figure 69. Scores métastatiques des souris traitées ou non avec 15 mg/kg d'Ohmlin ou 15 mg /kg d'édelfosine.....</b>	<b>193</b>
<b>Figure 70. Nombre de souris présentant des métastases détectées <i>in vivo</i>.....</b>	<b>194</b>
<b>Figure 71. Evolution du score <i>in vivo</i> en fonction du temps.....</b>	<b>195</b>
<b>Figure 72.Scores métastatiques pulmonaire et osseux pour les 3 groupes de souris. ....</b>	<b>195</b>
<b>Figure 73. Mesure de la quantité d'Ohmlin et d'édelfosine incorporées dans les tissus de souris non cancéreuses ayant reçu des injections à 15 mg/kg. ....</b>	<b>197</b>
<b>Figure 74. Mesure de la quantité d'Ohmlin et d'édelfosine incorporée dans les tissus de souris non cancéreuses ayant reçu des injections à 2,5 mg/kg. ....</b>	<b>197</b>
<b>Figure 75. Evaluation de la stabilité de l'incorporation de l'Ohmlin et de l'édelfosine dans les tissus de souris non cancéreuses ayant reçu des injections à 15 mg/kg. ...</b>	<b>198</b>
<b>Figure 76. Quantification de l'incorporation de l'Ohmlin et de l'édelfosine dans les tumeurs primaires. ....</b>	<b>199</b>
<b>Figure 77. Relation entre le poids de la tumeur primaire et la quantité d'éther-lipide incorporée. ....</b>	<b>200</b>
<b>Figure 78. Incorporation de l'Ohmlin dans les tissus de souris cancéreuses.....</b>	<b>201</b>
<b>Figure 79. Incorporation de l'édelfosine dans les tissus de souris cancéreuses.....</b>	<b>202</b>

## Liste des publications

### *Publication intégrée à la thèse*

Girault A., Haelters J.P., Potier M., Chantôme A., Pinault M., Marionneau-Lambot S., Oullier T., Simon G., Couthon-Gourves H., Jaffres P.A., Corbel B., Bougnoux P., Joulin V., Vandier C.. New alkyl-lipid blockers of SK3 channels reduce cancer cell migration and metastasis occurrence. *En cours de révision*.

### *Publications non intégrées à la thèse*

Potier M., Roger S., Chantome A., Gillet L., Girault A., Besson P., Gore J., Bougnoux P., Vandier C., LeGuennec J.Y.. Abnormal expression of ion channels participates in the metastatic development of epithelial cancers. *"Biophysics of Ion Channels and Diseases"*. Ed. Research SignPost 2009.

Chantome A., Girault A., Potier M., Collin C., Vaudin P., Pagès J.C., Vandier C., Joulin V. KCa2.3 channel-dependent hyperpolarization increases melanoma cell motility. *Experimental Cell Research*, 315 (2009), PP. 3620-3630.

Potier M., Tran T.A., Chantome A., Girault A., Joulin V., Bougnoux P., Vandier C., Pierre F. Altered SK3-mediated migration in Adenomatous Polyposis Coli (Apc) mutated mouse colon epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397(1): 42-7 (2010).

Potier M., Joulin V., Chantôme A., Girault A., Roger S., Besson P., Jourdan M.L., LeGuennec J.Y., Bougnoux P., Vandier C.. Identification of SK3/KCa2.3 channel as a new molecular target for cellular effect of edelfosine. *British Journal of Pharmacology*, 162(2):464-79 (2011).

### *Brevet*

Brevet d'invention Européen déposé par l'INSERM le 18 Février 2010, numéro de dépôt EP10305169.4 et intitulé : A method for preventing and treating cancer metastasis.

Philippe Bougnoux, Aurélie Chantôme, Bernard Corbel, Alban Girault, Jean-Pierre Haelters, Virginie Joulin, Marie Potier-Cartereau, Gaelle Simon, Christophe Vandier. Déposé au nom de l'INSERM, dépôt EP10305169.4)

# **Introduction**

La recherche en cancérologie est continuellement en quête de nouvelles cibles et de nouveaux traitements afin de soigner et d'améliorer la qualité de la vie des patients atteints de cancers. A l'heure actuelle, la majorité des traitements utilisables en clinique sont dirigés contre l'évolution et la progression de la tumeur primaire. Il est cependant établi que dans l'évolution d'un cancer, la formation des métastases est un événement dramatique en raison du manque de possibilités thérapeutiques. Les études s'attachant à clarifier les propriétés des cellules qui forment des métastases ou à comprendre les événements se déroulant pendant la cascade métastatique sont de plus en plus nombreuses. Diverses pistes, comme des inhibiteurs des intégrines qui sont des protéines membranaires intervenant dans la reconnaissance du support et dans la motilité, ont déjà été explorées mais se sont avérées décevantes. Il est donc indispensable de continuer à étudier les mécanismes impliqués dans la formation des métastases afin de pouvoir lutter efficacement contre ce phénomène.

Depuis une quinzaine d'années, les canaux ioniques, qui sont des protéines membranaires impliquées dans de nombreux phénomènes physiologiques par le contrôle des échanges ioniques, ont été montrés comme étant des acteurs importants dans les fonctions de la cellule cancéreuse comme la prolifération ou la résistance à l'apoptose. Il a également été montré que ces canaux pouvaient intervenir dans le phénomène de migration cellulaire, fonction qui est l'un des pré requis des cellules formant les métastases. Nous avons montré que le canal SK3, canal potassique de petite conductance activé par le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, était impliqué dans la migration de cellules cancéreuses mammaires, de cellules de mélanome ou de cellules de cancer du colon.

L'équipe Nutrition, Croissance, Cancer (INSERM U921) cherche à comprendre comment les lipides alimentaires et d'origine marine préviennent la récurrence métastatique. Il a été montré que l'utilisation d'acides gras insaturés, dont l'origine essentielle est les produits marins, pouvait altérer le fonctionnement des cellules cancéreuses et également, améliorer la tolérance et potentialiser les effets des traitements chez les patients atteints de cancer. Il est important de noter que parmi les lipides d'origine marine, les éther-lipides possèdent des propriétés bénéfiques. Ces éther-lipides sont capables de stimuler l'hématopoïèse et possèdent des propriétés anticancéreuses. A partir de ces composés naturels, des éther-lipides synthétiques ont été élaborés et ont permis de créer une nouvelle classe d'agents anticancéreux, les alkyl-glycérophospholipides dont le représentant le mieux caractérisé est l'édelfosine. Cet éther-lipide est capable d'induire l'apoptose de cellules cancéreuses mais possède également des propriétés anti-angiogéniques et anti-invasives. Nous avons montré récemment que ce

composé était également capable d'inhiber la migration cellulaire dépendante du canal SK3 des cellules MDA-MB-435s. Cependant, l'édelfosine présente une certaine toxicité envers les cellules non cancéreuses et lors de son utilisation en clinique différents effets secondaires délétères ont motivé l'arrêt de son utilisation.

Le travail que nous nous sommes proposés de faire durant cette thèse est la caractérisation des éléments structuraux de l'édelfosine nécessaires à l'inhibition de la migration cellulaire et du canal SK3. A partir de cette étude préliminaire, nous avons souhaité sélectionner un ou des analogues de l'édelfosine possédant des propriétés inhibitrices équivalentes vis-à-vis de la migration cellulaire et du canal SK3, caractériser leurs mécanismes d'action et évaluer leurs propriétés *in vivo* dans des modèles murins de cancers métastatiques.

## **Historique et état actuel des connaissances**

# I. Le cancer : généralités et métastases

## A. Généralités

Le cancer est une pathologie décrite dès l'antiquité par Hippocrate. La terminologie de cancer vient des premières descriptions des tumeurs dont la morphologie pouvait être assimilée à la forme du crabe d'où la dénomination de « Karkinos ».

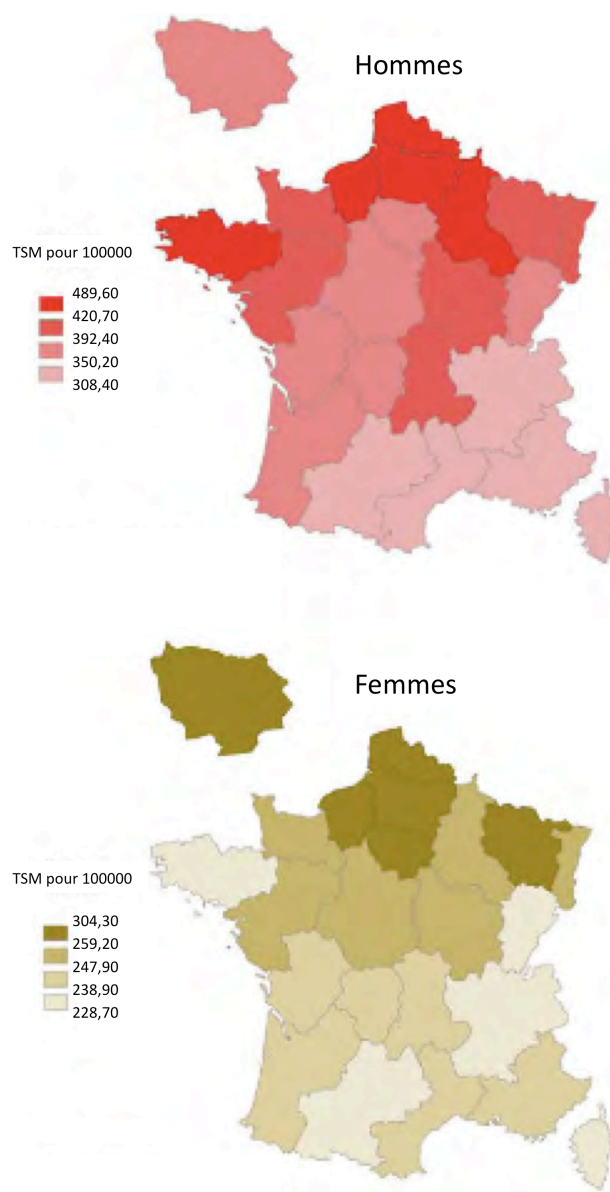
D'un point de vue biologique le cancer se définit par un dysfonctionnement d'une cellule qui va acquérir de nouvelles capacités de prolifération, de résistance à la mort cellulaire et de migration. L'évolution sera une prolifération anarchique avec un envahissement du tissu originel puis des tissus avoisinants et à terme un échappement vers des tissus éloignés. D'un point de vue médical, le terme cancer regroupe tout un ensemble de syndromes possédant des caractéristiques et des évolutions différentes, il conviendrait de parler de cancers, au pluriel.

Cette pathologie a été pendant très longtemps une maladie incurable. Les progrès médicaux (diagnostiques, thérapeutiques et techniques) ainsi que l'avancement de la connaissance de la pathologie permettent dorénavant de guérir ou de ralentir l'avancée de la maladie. Cependant, malgré l'ensemble de ces évolutions, le cancer reste un problème de santé publique majeur en France et dans l'ensemble des pays développés.

L'épidémiologie permet le recensement et l'étude de l'état de santé des populations. Le recueil de ces données est une tâche longue et qui nécessite de nombreux critères afin d'obtenir des informations précises et informatives.

Parmi les données récentes obtenues concernant le cancer en France, le « 2<sup>ème</sup> rapport d'étape au Président de la République » du Plan Cancer 2009-2013 communique les principales informations chiffrées suivantes : (i) L'incidence des cancers est en hausse. En 2010, environ 357 500 nouveaux cancers ont été détectés ce qui représente une progression de +1,2 % chez l'Homme et +1,4 % chez la Femme en moyenne par an entre 1980 et 2005. L'âge moyen du diagnostic est d'environ 65 ans. (ii) La mortalité par le cancer est en baisse mais continue à représenter la cause majeure de décès chez les hommes et la seconde pour les femmes. Il est à noter que le tabac reste la première cause de décès liée au cancer en France comme dans le

monde. (iii) L'un des derniers éléments présentés dans ce rapport est la disparité de l'impact des cancers au niveau géographique (Figure 1). Les taux d'incidence les plus élevés se retrouvent dans la moitié Nord du pays.



**Figure 1. Incidence des cancers en 2005 en France métropolitaine.**

Taux standardisés à la population mondiale tous cancers à l'échelle régionale. TSM : Taux Standardisé de mortalité pour 100 000. Modifié d'après le « 2<sup>ème</sup> rapport d'étape au Président de la République » du Plan Cancer 2009-2013.

En observant la répartition des cancers en fonction du sexe, les cancers de la prostate, du poumon et colorectaux sont les plus fréquents chez l'Homme. Chez la Femme, le cancer majoritaire reste le cancer du sein mais les cancers colorectaux et broncho-pulmonaires sont également très fréquents.



## B. Biologie de la cellule cancéreuse

Les grandes avancées ayant permis des progrès majeurs dans la détection, la prévention et le traitement des cancers sont liées à l'évolution des connaissances sur les propriétés fondamentales des cellules cancéreuses. Cette cellule va acquérir au cours de sa transformation différentes propriétés lui permettant de proliférer, de résister à la mort cellulaire et de devenir agressive. Cependant, la grande variabilité des modifications observées dans les cellules cancéreuses entraîne des difficultés pour le traitement. De plus, cette cellule cancéreuse va recruter par la sécrétion de différents facteurs des cellules normales de l'environnement proche qui vont former le stroma tumoral. La multiplicité de ces assemblages complique la compréhension des mécanismes de la tumorigénèse.

### 1. Le développement du cancer

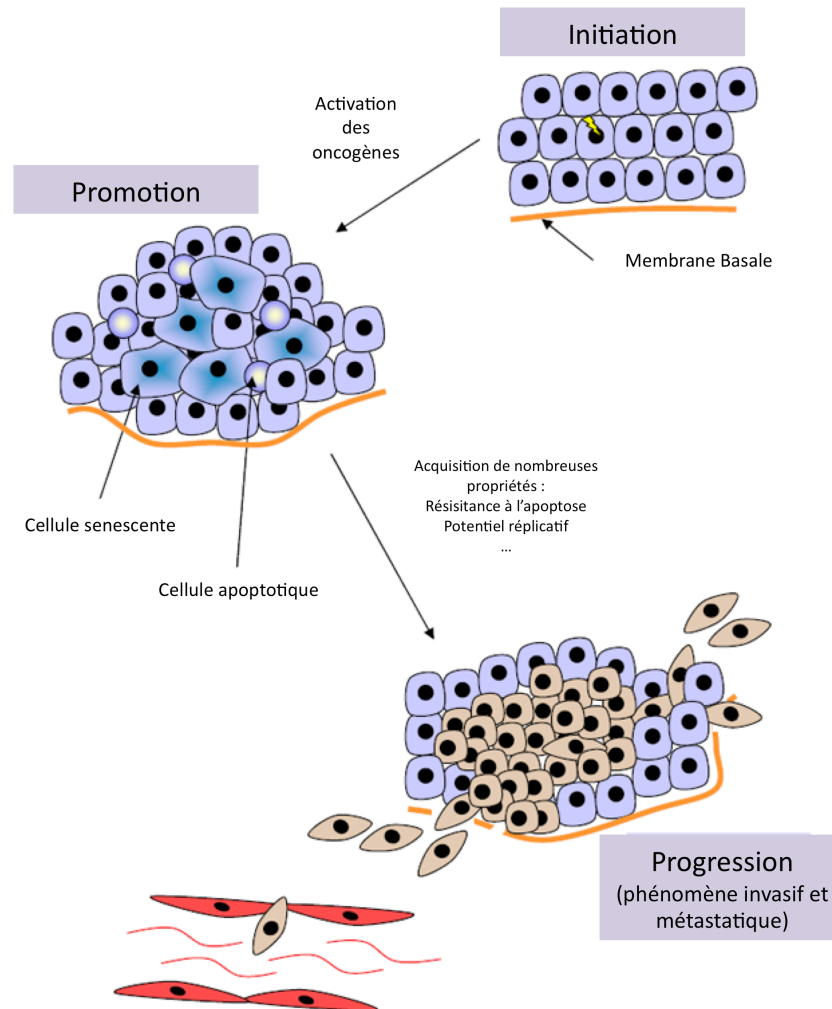
Le développement d'un cancer est dû à différentes causes. Certains cancers sont provoqués par une modification du génome (mutations), par la transmission à la génération suivante, par le vieillissement ou induits par différents agents infectieux comme des virus (Kao, J. H. *et al.*, 2010; Rajcani, J. *et al.*, 2010). D'autres cancers vont être déclenchés par des facteurs environnementaux comme le mode de vie (consommation d'alcool ou de tabac), l'exposition à des radiations (Pfeifer, G. P. *et al.*, 2002; Castronovo, V. 2003). Cependant, l'état actuel des connaissances pousse l'ensemble de la communauté scientifique et médicale à penser que dans la majorité des cas le développement des cancers est un phénomène multiparamétrique lié aux différents éléments cités précédemment.

La cancérogénèse est décrite depuis le début des années 80 comme suivant un développement en 3 étapes : l'initiation, la promotion et la progression (Figure 2) (Farber, E. 1984; Harris, C. C. 1991; Jakobisiak, M. *et al.*, 2003).

#### a) L'étape d'initiation

L'initiation est l'apparition des premières modifications au niveau de l'ADN suite à l'exposition à des cancérogènes externes (chimiques, radiations...) ou à des mutations. Ces premières modifications vont permettre à cette cellule ou à cette petite population cellulaire d'acquérir de nouvelles propriétés essentielles à son développement. Ces modifications vont avoir pour conséquence une altération des réponses aux signaux intra- ou inter- cellulaires. La relation à l'environnement est également changée. Par exemple, la réponse aux facteurs

inhibant la prolifération cellulaire peut être diminuée ce qui peut entraîner l'expansion et la sélection d'un petit groupe cellulaire. Les cellules ayant subi ces modifications ne formeront pas obligatoirement une tumeur et peuvent continuer à fonctionner normalement.



**Figure 2. Etapes du développement cancéreux.**

Modifié et adapté d'après Bastid *et al.*, 2009. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. (<http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/TWISTinCancerID20081.html>)

#### b) L'étape de promotion

L'étape de promotion représente une expansion focalisée du groupe de cellules initiées. Ces cellules qui auront subi les premières modifications liées à l'initiation vont créer un environnement favorable à leur développement. Lors de cette phase, les mutations et les modifications génétiques vont continuer à apparaître. La promotion est une période présentant comme caractéristique importante une forte instabilité génomique. Cette période est propice à l'altération de gènes importants : activation des proto-oncogènes ou extinction des gènes

suppresseurs de tumeurs. A cette étape, la probabilité que le groupe de cellules qui forme des nodules ou des polypes devienne un cancer augmente énormément.

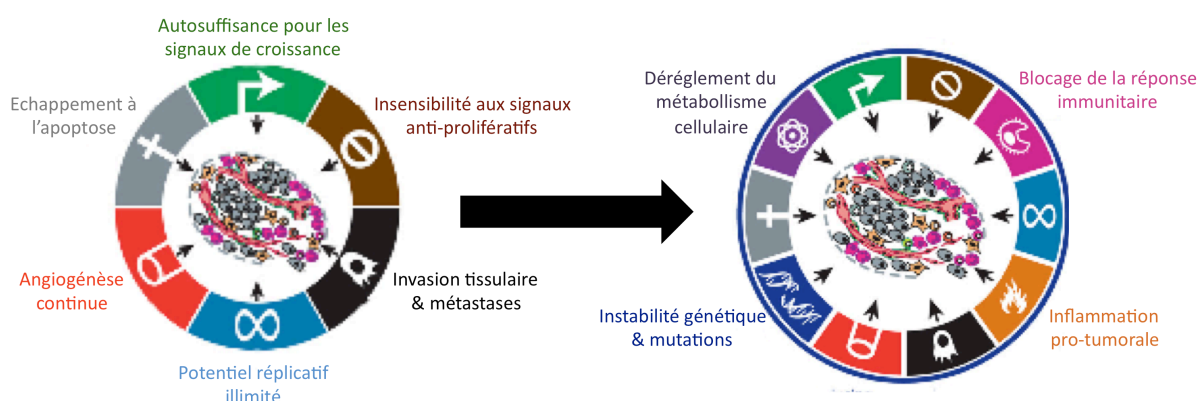
### c) L'étape de progression

La dernière phase correspond à la progression. On observe une évolution plus ou moins rapide des masses cellulaires vers la transformation cancéreuse. Il faut souligner le fait qu'il n'existe pas de transition franche entre promotion et progression. C'est un phénomène progressif au cours duquel les événements se succèdent petit à petit. Le site primaire subit un envahissement de plus en plus important et l'environnement se transforme en un site favorable et dédié à la prolifération cellulaire. D'autre part, il est également observé un échappement de cellules, ayant subi des modifications importantes, vers des sites secondaires conduisant à la formation de micro-métastases puis de métastases.

## 2. La cellule cancéreuse

Comme nous venons de le voir succinctement, la formation du cancer se déroule en plusieurs étapes. Il a été établi qu'au cours de ces transformations, la cellule cancéreuse acquiert de nouvelles propriétés. Hanahan et Weinberg ont rapporté les éléments majeurs de ces modifications au travers de la revue « The Hallmarks of Cancer » en 2000 (Hanahan, D. *et al.*, 2000). Ils ont ainsi proposé que les événements majeurs pouvaient être regroupés en 6 caractéristiques fondamentales (Figure 3) : indépendance pour les signaux de croissance, insensibilité aux signaux antiprolifératifs, invasion tissulaire et métastases, propriété de réplication illimitée, angiogenèse indépendante et résistance à l'apoptose. Cependant, lors de ce premier état des connaissances, ils ont présenté une vision « réduite » de l'étude du phénomène en restant à l'échelle d'une cellule et de son environnement proche. En 2011, en mettant à jour les données acquises pendant la dernière décennie, ils ont intégré l'ensemble des facteurs provenant de l'organisme (Hanahan, D. *et al.*, 2011). La cellule cancéreuse n'est pas seule à évoluer au cours du processus de cancérisation. Les interactions ou les signaux en provenance du milieu environnant comme des signaux inflammatoires ou les relations avec le système immunitaire participent à ces modifications. Ils ont ainsi rajouté 4 grands paramètres (Figure 3) : dérèglement du métabolisme cellulaire, blocage de la réponse immunitaire, inflammation pro-tumorale et instabilité génétique associée et responsable de mutations.

Toutes ces grandes caractéristiques ont été associées de manière plus ou moins étroite à différentes protéines. Par exemple, la protéine p53 est la mieux connue des protéines suppresseurs de tumeurs. Dans plus de la moitié des cancers humains, cette protéine est absente ou mutée ce qui entraîne une perte de fonction. Des modifications de p53 ont été rapportées à de nombreuses reprises pour être impliquées dans la résistance à l'apoptose (Brady, C. A. *et al.*, 2010). Plus récemment, cette même protéine a été impliquée dans la migration cellulaire comme cela a été présenté dans la revue de P. Muller (Muller, P. A. *et al.*, 2011).



**Figure 3. Modifications acquises par les cellules cancéreuses.**

Présentation des caractéristiques fondamentales acquises par la cellule cancéreuse et mise à jour dans la 2<sup>ème</sup> version de la revue «Hallmarks of cancer ». Modifié d'après Hanahan D. and Weinberg R.A., 2011.

Malgré les différentes possibilités thérapeutiques existantes, peu d'entre elles sont efficaces à plus ou moins long terme. En effet, le fait qu'une fonction soit réalisée par différentes protéines et/ou soit la conséquence de l'activation de différentes voies de signalisation provoque une résistance des cellules cancéreuses aux composés actifs d'où la nécessité d'envisager des thérapeutiques visant plusieurs cibles.

### C. Migration et métastases

Si les progrès techniques et médicaux permettent une détection et une résection de plus en plus précoce de la tumeur primaire, la formation des métastases est un problème majeur en clinique et la cause principale de décès liés au cancer. En effet, l'envahissement de tissus éloignés du site primaire de la tumeur peut affecter différentes fonctions vitales et ainsi provoquer le décès du patient. Pour arriver à cet état, les cellules qui se sont échappées du site original de la tumeur ont dû acquérir des propriétés de migration et d'invasion cellulaire. Comme de nombreux aspects de la recherche fondamentale en cancérologie, les études

concernant la migration cellulaire étaient généralement centrées sur la cellule cancéreuse. De nouveaux travaux concernant la migration cellulaire ont porté sur l'étude des éléments environnants comme la matrice extracellulaire (MEC) ou les autres cellules présentes au sein de la tumeur ou plus largement dans l'organisme. La compréhension de ces mécanismes et leur modulation sont des enjeux majeurs aussi bien en terme de prédiction que de thérapeutique.

## 1. La migration cellulaire

### a) Généralités

La migration cellulaire est un phénomène important que l'on rencontre au cours de différentes étapes physio/pathologiques d'un organisme. Dès l'embryogenèse, les cellules présentent une forte capacité à migrer afin de développer les nouveaux organes et de former les différentes structures vitales. La migration reste également importante chez l'organisme adulte, que ce soit lors de phénomènes physiologiques ou pathologiques. Par exemple, dans la réponse inflammatoire, les leucocytes doivent migrer vers le site touché afin de réaliser la réponse immunitaire et la phagocytose (Wong, C. H. *et al.*, 2010). La migration des fibroblastes et des cellules endothéliales est également primordiale pour la réparation en cas de lésions (Barrientos, S. *et al.*, 2008). Du point de vue pathologique, la formation de métastases cancéreuses requiert la migration des cellules cancéreuses du site de la tumeur primaire vers le système circulatoire puis vers de nouveaux tissus (Yilmaz, M. *et al.*, 2010).

L'invasion et la migration correspondent à des états dynamiques de coordination entre adhésion et dégradation de la MEC. De nombreux partenaires doivent intervenir dans ces mécanismes pour que la cellule puisse se déplacer. D'une part, le cytosquelette composé d'actine ainsi que les protéines d'adhésion comme les cadhérines ou les intégrines vont participer à l'adhésion et à l'obtention d'un phénotype migratoire. D'autre part, différents types de protéases (à sérine, cathepsine, métalloprotéinase matricielle (MMP)) vont réguler la dégradation de la MEC et faciliter la mobilité des cellules.

### b) Les différents mécanismes de la migration cellulaire

On distingue deux modes de migration cellulaire :

I- Les cellules peuvent être mobiles selon un mode dit « amiboïde ». Dans ce cas, les cellules vont être peu polarisées, avec un phénotype globalement rond et peu adhésives. Par une

succession de contraction/relaxation du cytosquelette, la cellule va se déplacer en s'appuyant contre les éléments environnants. Ces contractions vont également créer des variations de flux du cytoplasme qui peuvent créer des protrusions, au niveau du front de migration, de type « bleb ». Ces anneaux de constriction et ces allongements de la partie avant de la cellule vont lui permettre de se déplacer au travers des mailles de la MEC en se déformant.

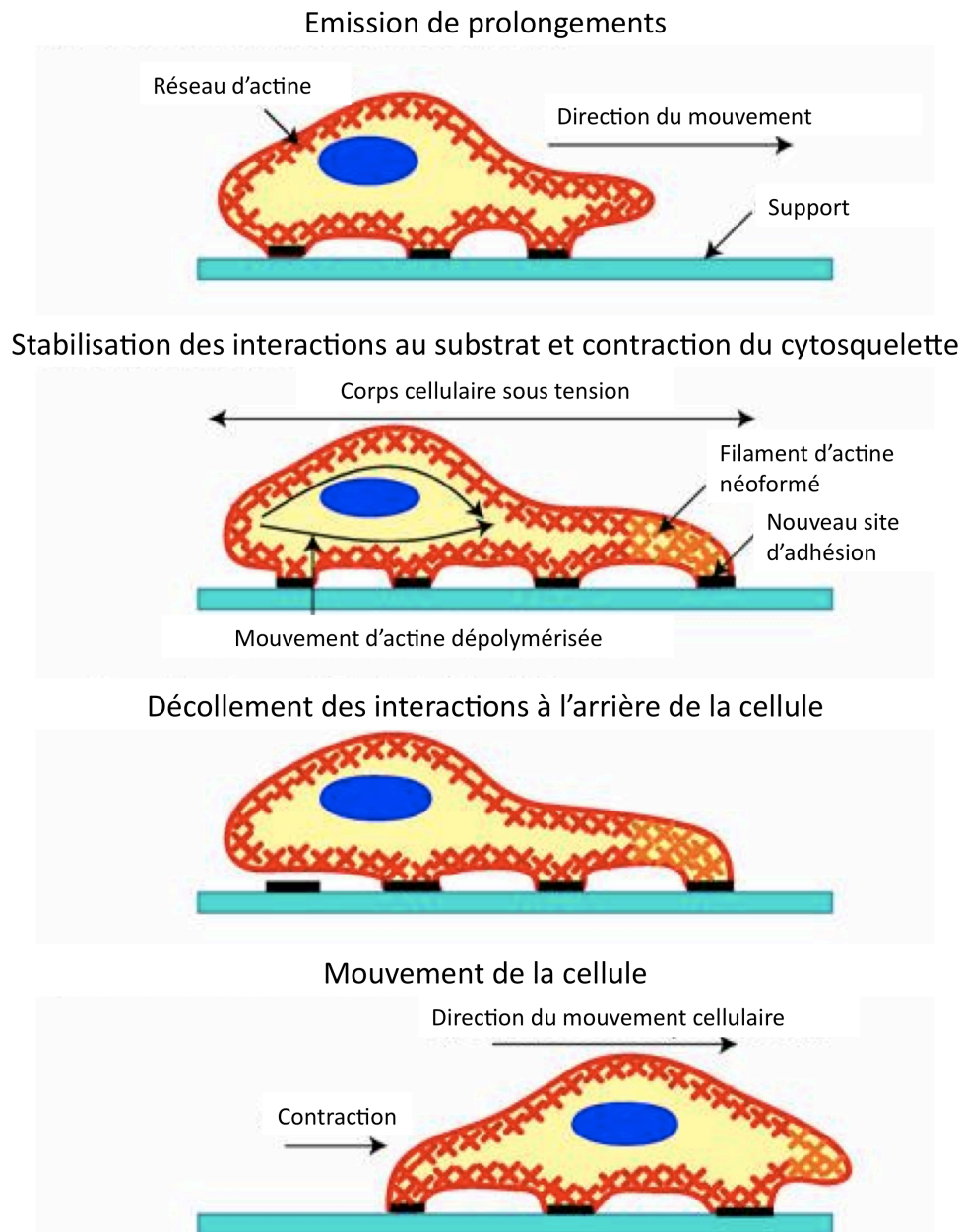
II- Le second mode de migration cellulaire est la migration mésenchymateuse. Dans ce mécanisme, les cellules vont utiliser des protéases afin de dégrader l'environnement et utiliser des intégrines pour se fixer à celui-ci. Suite à la fixation du front de migration, le cytosquelette va se contracter et rétracter la partie arrière qui se détache du support.

L'étude de la migration cellulaire peut être réalisée dans deux conditions. Dans le premier cas, les cellules vont se déplacer dans un système en deux dimensions (2D). C'est à dire qu'elles sont déposées sur un support plat (comme une boîte de culture) et l'observation ne se fera que dans un seul plan. Dans le second cas, les cellules sont incluses dans une matrice en trois dimensions (3D) comme par exemple une couche de matrigel. Dans cette configuration, les cellules pourront se déplacer dans tous les plans de l'espace. Le type de matrice peut influencer le mode de migration cellulaire. Le choix des conditions est donc fondamental pour l'observation d'un phénomène donné.

Le mécanisme de la migration mésenchymateuse peut être décrit selon une succession de 4 étapes (Figure 4) (Lauffenburger, D. A. *et al.*, 1996) :

- La cellule va d'abord émettre des prolongements dans le sens du mouvement. Ces prolongements peuvent être de différents types (pseudopodes, filopodes, lamellipodes) et vont apparaître suite à la fixation de protéines d'adhésion à la MEC comme les intégrines.
- Les protéines d'adhésion vont former des clusters et les voies de signalisation intracellulaires correspondantes à ces récepteurs vont s'activer. Celles-ci vont entraîner le recrutement de protéines de liaisons avec le cytosquelette comme par exemple la Paxilline (Mackinnon, A. C. *et al.*, 2011). Il s'agit de l'étape de stabilisation.
- Le cytosquelette va se contracter afin de créer les forces de tensions nécessaires à la progression de la cellule dans le sens de migration souhaité.
- Les complexes de fixation à la MEC situés à l'arrière de la cellule vont se désassembler et se décrocher du support. En parallèle, les forces de tensions créées par

la contraction du cytosquelette vont permettre la rétractation de cette partie à l'arrière du mouvement.



**Figure 4. Schéma de la migration cellulaire dans un environnement en 2 dimensions.**

Modifié d'après Ananthakrishnan & Erlicher, 2007.

Cette décomposition en quatre étapes décrit de manière très adaptée la migration observée dans un système en 2 dimensions. Cependant, *in vivo* ou dans certains tests *in vitro*, les cellules sont situées dans un environnement en 3 dimensions. Dans ce cas, le processus peut nécessiter le recrutement de protéases afin de dégrader et/ou remodeler la matrice pour progresser. Il a ainsi été démontré dans différents types de cancers qu'au niveau des clusters

d'intégrines, certaines MMP étaient co-localisées (Morozevich, G. *et al.*, 2009; Saito, Y. *et al.*, 2010; Sen, T. *et al.*, 2010).

La migration cellulaire dans un environnement 3D n'est cependant pas forcément accompagnée du recrutement de protéases pour remodeler la MEC. En 2003, l'équipe de Friedl a mis en évidence que les cellules pouvaient passer du mode mésenchymateux à amiboïde (Wolf, K. *et al.*, 2003). Les cellules peuvent se déplacer au sein d'un tissu ou d'une matrice sans la remodeler mais en se déformant de manière à passer entre les mailles non extensibles. Dans ce cas, les cellules utilisent la migration amiboïde, décrite précédemment. En fonction de l'environnement et des contraintes appliquées aux cellules, le mode de migration peut varier, passant de la motilité amiboïde à la migration mésenchymateuse ou inversement.

Pour décrire le passage de l'un à l'autre, le terme de transition mésenchymale-amiboïde est utilisé. Différentes voies de signalisations semblent nécessaires pour ce type de transition. Plusieurs études montrent une forte implication des protéines de la famille des Rho GTPases. Par exemple, dans des cellules de glioblastome et de fibrosarcome, respectivement les U87MG et les HT1080, les différentes isoformes de protéine Rac sont essentielles au maintien d'une migration mésenchymateuse (Yamazaki, D. *et al.*, 2009). L'un des mécanismes proposé est l'activation de voies de signalisation couplées aux intégrines membranaires qui activent cette famille de protéines nécessaires à la formation des protrusions. Une seconde étude a également montré que la protéine Smurf1 qui intervient dans la dégradation de RhoA était importante pour le mode de migration employé par différents types de cellules cancéreuses (MDA-MB-231, HT1080...) (Sahai, E. *et al.*, 2007). Malgré les progrès réalisés dans la compréhension des deux modes de migration, les mécanismes provoquant la transition entre ces modes ne sont pas encore tous élucidés.

### c) La polarisation cellulaire

L'un des pré requis de la migration cellulaire est la polarisation du cytosquelette qui modifie la forme cellulaire et la prépare à se déplacer (Verkhovsky, A. B. *et al.*, 1999). Ce phénomène nécessite différents éléments pour être réalisable. Tout d'abord les cellules vont être sensibles à des éléments chimio attractants à l'aide de différents types de récepteurs (par exemple, les récepteurs au VEGF, au FGF...). Par la suite, la machinerie nécessaire à la migration va s'activer et différents phénomènes vont se réaliser. La cellule va établir des liens entre la MEC et les composants du cytosquelette. Ces structures s'appellent les points focaux



d'adhésion. Ils sont constitués par des clusters d'intégrines, des protéines constituant le cytosquelette et des protéines intermédiaires réalisant un pont entre les intégrines et le cytosquelette. Il a été montré que ces points d'attache au substrat étaient mobiles en permanence dans une cellule à l'arrêt. Cette mobilisation des points focaux va permettre à la cellule une orientation rapide vers les signaux chimio attractants (Smilenov, L. B. *et al.*, 1999). Quand la cellule commence à se déplacer, les points focaux vont se fixer au substrat et les fibres de stress qui y sont reliées vont pouvoir se contracter et entraîner le mouvement cellulaire. Les phénomènes de régulation spatio-temporelle au sein de la cellule lors de la migration sont très importants.

Deux mécanismes peuvent participer à la bonne localisation des protéines : (i) des protéines auront leurs mouvements limités en raison d'une « barrière de diffusion », (ii) d'autres seront maintenues à leur position par un mécanisme d'endo/exo-cytose (Altankov, G. *et al.*, 1993). Certains éléments doivent se situer au niveau du front de migration comme les récepteurs aux chimiokines. Dans les lymphocytes, l'orientation de ces récepteurs a été présentée comme un élément majeur augmentant la réponse cellulaire aux signaux chimio attractants (Nieto, M. *et al.*, 1997). Dans le phénomène de migration, les canaux ioniques sont également impliqués. L'activité et la fonction de ces protéines membranaires doivent également être localisées. Très récemment, Schwab et ses collaborateurs ont montré un système dynamique dépendant de la clathrine qui maintient le canal IKCa au niveau du front de migration où il peut ainsi participer à la motilité cellulaire (Schwab, A. *et al.*, 2011). Cependant, comme cela a été présenté précédemment par le même groupe, ce canal semble uniquement actif à l'arrière de la cellule en migration (Schwab, A. *et al.*, 2006).

#### d) Intégrines et migration cellulaire

Concernant l'adhésion cellulaire, la relation entre les intégrines et leurs ligands est un phénomène très important pour la vitesse de migration (Palecek, S. P. *et al.*, 1997). Ainsi, l'augmentation du nombre d'intégrines à la membrane ou de l'affinité de ces récepteurs pour leurs ligands entraîne des variations de la vitesse de migration. Ce type d'observations permet d'ouvrir des possibilités thérapeutiques en cherchant à intervenir sur ces paramètres. Il est reconnu que les intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  participent à l'angiogenèse tumorale (Hodivala-Dilke, K. M. *et al.*, 2003). Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs dirigés contre ces intégrines n'a pas permis d'obtenir de résultats concluants en clinique (Tucker, G. C. 2006). L'une des explications apportée au manque d'efficacité est présentée dans l'étude de Reynolds parue

dans Nature Medicine en 2009 (Reynolds, A. R. *et al.*, 2009). Dans les heures suivant l'injection des inhibiteurs, leurs concentrations plasmatiques diminuent fortement pour se stabiliser aux environs du nanomolaire. Or, l'utilisation *in vitro* et *in vivo* de faibles quantités (concentrations de l'ordre du nanomolaire) de ces inhibiteurs peut paradoxalement entraîner la croissance de la tumeur ainsi que l'angiogenèse. Ces phénomènes pourraient être responsables du manque d'activité observé dans les différents essais cliniques réalisés.

#### e) Le calcium, médiateur de la migration cellulaire

Le  $\text{Ca}^{2+}$  est un médiateur important de la migration cellulaire. Dans les phénomènes de motilité cellulaire, le  $\text{Ca}^{2+}$  peut réguler la formation et le « turn-over » des filaments d'actine, l'assemblage et le renouvellement des points focaux d'adhésion, l'activité d'enzymes, l'activité des canaux KCa.

En 1997, Huttenlocher a montré que l'inhibition de la calpaïne, une enzyme dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , ralentissait le détachement de la partie arrière de la cellule et que cette inhibition provoquait un renforcement du lien entre le cytosquelette et les intégrines (Huttenlocher, A. *et al.*, 1997). Ceci s'explique par le fait que de nombreux constituants des points focaux d'adhésion sont des substrats de la calpaïne (Carragher, N. O. *et al.*, 2002). De plus, l'activation de cette enzyme est régulée par l'Epidermal Growth Factor ou EGF, une chimiokine fortement impliquée dans la migration cellulaire.

Les améliorations techniques de l'imagerie calcique et l'accumulation de données sur les mécanismes de la migration dépendants du  $\text{Ca}^{2+}$  ont permis de proposer différents modèles comme par exemple celui présenté par Valeyev (Valeyev, N. V. *et al.*, 2006). Cette équipe a relié les oscillations locales de  $\text{Ca}^{2+}$  liées aux canaux calciques sensibles à l'étirement avec le désassemblage des points focaux par la calpaïne dans la lignée U87 de glioblastome.

D'autres protéines dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  comme la calmoduline (CaM) ont une activité lors des phases de migration. Durant la migration, la CaM se fixe à la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK). La présence ou l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  peut donc moduler la force de contraction et la formation des fibres de stress par l'intermédiaire de la CaM (Yuan, J. *et al.*, 2008).

Le  $\text{Ca}^{2+}$  peut également servir de médiateur dans les voies de signalisation participant à la motilité cellulaire. L'activation de l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  dans la lignée de mélanome A2058 a pour

conséquence une augmentation de la concentration calcique intracellulaire qui est biphasique : une phase rapide due au relargage des stocks intracellulaires puis une phase prolongée provoquée par l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  en provenance de l'extérieur de la cellule (Hodgson, L. *et al.*, 2001). Ces augmentations de  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau intracellulaire participent à la motilité de ces cellules.

Depuis longtemps, il est connu que les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  au sein de la cellule ne sont pas constantes. Dans le modèle cellulaire des fibroblastes utilisé à de très nombreuses reprises pour comprendre les mécanismes régulant la migration, Hahn a décrit en 1992 un gradient décroissant de concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  de l'arrière vers l'avant de la cellule (Hahn, K. *et al.*, 1992). Au vu des éléments présentés précédemment, il est clair que les variations de concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans une cellule mobile sont importantes. Elles favorisent le décrochage à l'arrière, la contraction du cytosquelette ou bien la formation des points d'adhésion focaux au niveau du front de migration.

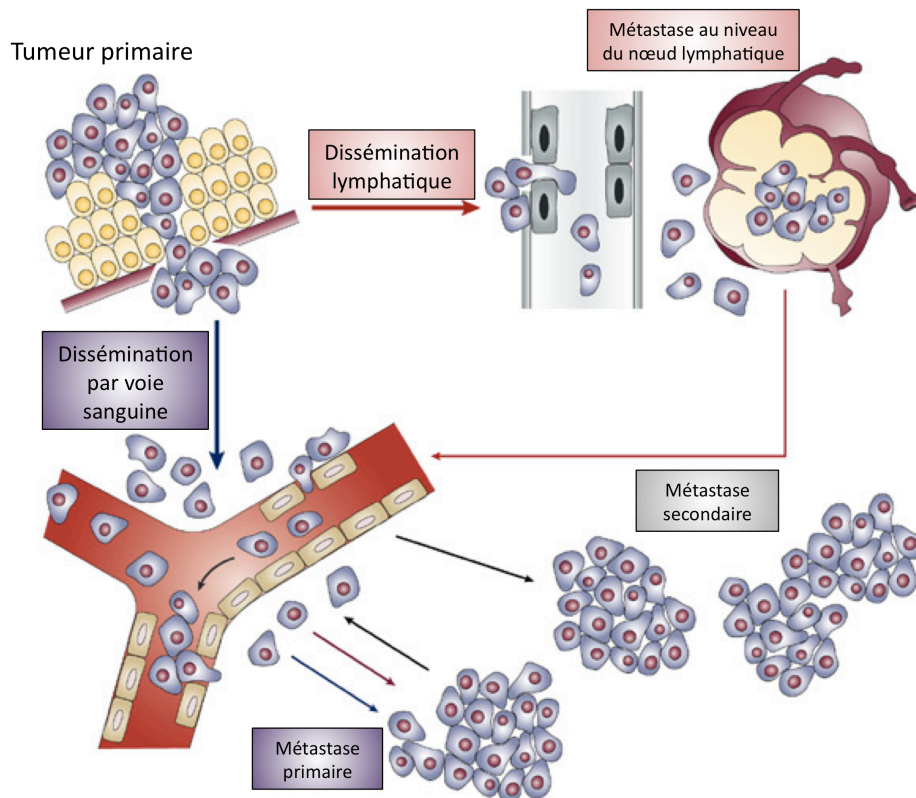
L'origine du  $\text{Ca}^{2+}$  utilisé lors de la migration peut avoir différentes origines. Par exemple, dans des cellules d'astrocytomes, il a été montré que le  $\text{Ca}^{2+}$  pouvait provenir de réserves intracellulaires mais également du milieu extracellulaire (Ronde, P. *et al.*, 2000).

La régulation de l'homéostasie calcique dans les cellules cancéreuses ouvre de nouvelles opportunités thérapeutiques. L'utilisation d'outils pharmacologiques bloquant l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  ou l'un des effecteurs dépendants du  $\text{Ca}^{2+}$  pourrait permettre la mise en place de nouvelles approches complémentaires aux traitements actuels. La revue de Monteith, parue en 2007, présente ainsi la possibilité de cibler les canaux et les ATPases transportant du  $\text{Ca}^{2+}$  afin d'offrir de nouveaux traitements aux patients atteints de cancer (Monteith, G. R. *et al.*, 2007).

## 2. Les métastases

### a) Généralités

La formation des métastases intervient dans la phase de progression si l'on se reporte au schéma du phénomène général de la cancérisation (Figure 2). Il s'agit du déplacement de cellules cancéreuses dans un site distinct de la tumeur primaire et du développement d'une tumeur secondaire au sein de ce nouveau site. La formation de métastases est un phénomène multifactoriel. Comme pour la migration, il existe une description classique des différentes étapes de ce phénomène (Figure 5).



**Figure 5. Schéma de la cascade métastatique.**

Modifié d'après Pantel & Brakenhoff, 2004.

#### b) La cascade métastatique

Dans un premier temps, certaines cellules épithéliales initiées vont se modifier et acquérir un profil de cellules mésenchymateuses. Il s'agit de la transition épithélio-mésenchymateuse. Durant ce changement de phénotype, les cellules vont acquérir un profil migratoire leur permettant de s'échapper du site de la tumeur primaire. En parallèle, la membrane basale séparant l'organe de l'environnement proche va être rompue. Ceci va être lié aux recrutements de protéases par les cellules tumorales et les fibroblastes qui remodelent l'environnement cellulaire. Les cellules mésenchymateuses vont se détacher de la masse tumorale et vont envahir les tissus avoisinants. Les cellules vont alors s'introduire dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques, il s'agit de l'intravasation. Elles sont transportées par le flux jusqu'à différents organes cibles où elles réalisent l'extravasation. Arrivées dans ce nouveau site, les cellules vont développer une nouvelle tumeur. Dans certains cas, les cellules pourront rester dans un état de dormance prolongée (survie et absence de prolifération) et des

micrométastases seront observées. Cependant, lorsque l'environnement est adéquat à leurs propriétés de prolifération, les cellules vont former une tumeur secondaire ou métastase.

De nombreux mécanismes interviennent au cours du processus métastatique. La cellule cancéreuse doit acquérir différentes propriétés nécessaires au franchissement des barrières (membrane basale de l'organe, paroi des vaisseaux), à la migration ou bien encore à la détection des éléments de l'environnement. L'élément fondamental à la réalisation de ce processus est l'acquisition de la propriété de migration que nous avons décrit précédemment.

### c) La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

La première étape initiant la cascade métastatique va être la perte de la cohésion intercellulaire. Dans les tissus épithéliaux, l'une des protéines majeure régulant l'adhésion intercellulaire est la cadhérine E. La perte de cette protéine est liée à une mutation sur le gène codant pour celle-ci ou à des modifications sur différentes voies de signalisation la régulant. Cette protéine joue un rôle important de suppresseur de tumeur. D'autre part, la diminution de l'expression de cette cadhérine a été inversement corrélée à la dédifférenciation des cellules et à leurs propriétés invasives (Frixen, U. H. *et al.*, 1991; Bringuier, P. P. *et al.*, 1993; Gamallo, C. *et al.*, 1993). En parallèle de cette diminution, il est souvent observé l'expression ectopique de cadhérine N qui est retrouvée normalement au niveau des tissus neuronaux et des fibroblastes. L'expression de cette protéine augmente l'invasion des cellules en raison de son interaction avec le récepteur au FGF (Suyama, K. *et al.*, 2002). En effet, la coopération de ces protéines active de manière importante la voie MAPK-ERK provoquant une forte transcription du gène de la MMP-9. La succession de ces événements va faciliter l'échappement de cellules du site primaire de la tumeur. Ces différentes transformations de la cellule épithéliale vers un profil mésenchymateux, c'est à dire sans liaison inter cellulaire et avec une augmentation des propriétés migratoires, correspondent à la TEM qui intervient à l'initiation de la cascade métastatique (pour revue (Micalizzi, D. S. *et al.*, )). Plusieurs propriétés utiles lors de l'embryogenèse sont remises en fonction lors du développement d'un cancer. La TEM ainsi que la réexpression de certains gènes fœtaux sont, par exemple, des mécanismes qui sont réacquis lors du développement des cellules cancéreuses.

#### d) Invasion de l'environnement

Lors de l'envahissement du tissu environnant, deux cas de figure ont été observés. Les cellules s'échappent de manière isolée ou bien elles réalisent une invasion collective. Le choix du mode de migration employé par les cellules va dépendre de nombreux éléments tels que la structure de l'environnement (structure, composition de la MEC) ou encore de l'existence ou non de jonctions intercellulaires. La revue de Peter Friedl et Katarina Wolf décrit de manière exhaustive tous ces paramètres (Friedl, P. *et al.*, 2010).

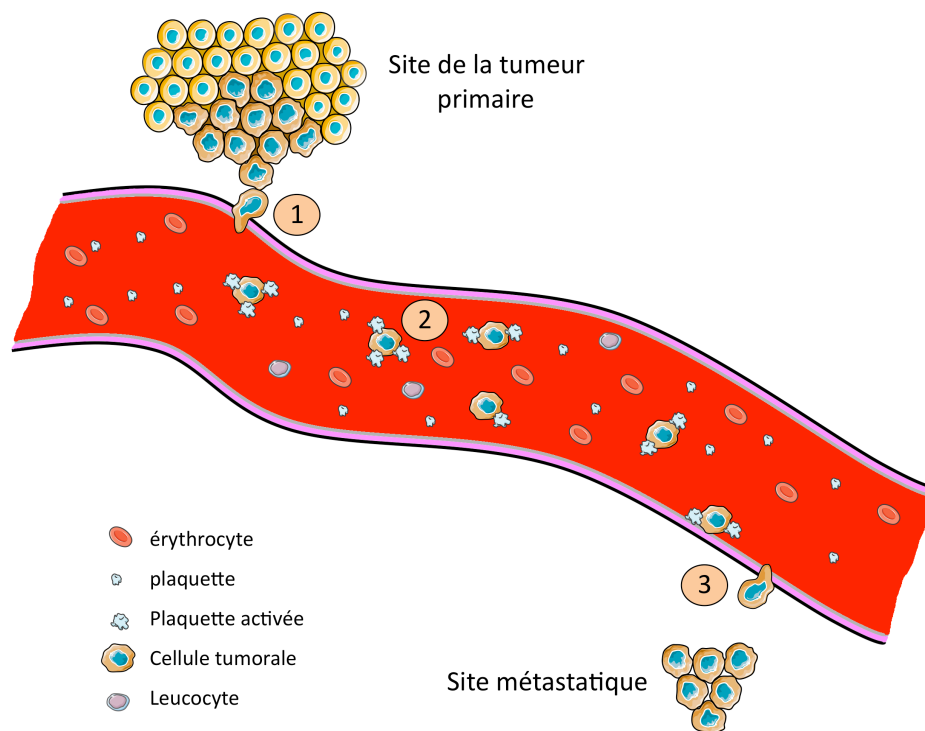
Les cellules qui s'échappent de manière isolée peuvent utiliser différents modes de migration : la migration amiboïde, la migration mésenchymateuse et peuvent être solitaires ou bien migrer en file indienne. Dans le cas de la file indienne, la première cellule dégrade la MEC et fraye le passage facilitant la mobilité des cellules suivantes avec lesquelles il n'y a plus aucun contact physique.

La migration collective va présenter certains avantages pour les cellules cancéreuses. Dans ce cas, le groupe de cellules va pouvoir contenir des clones possédant de multiples et diverses propriétés (prolifération, migration, sécrétion de protéases...). D'autre part, le maintien des jonctions intercellulaires va protéger les cellules de l'anoïkie. Il s'agit du mécanisme de mort cellulaire provoquée par la perte des adhésions intercellulaires. Ce phénomène peut être l'une des raisons du manque d'efficacité de l'échappement de cellules isolées. Il a toutefois été montré dans de nombreux modèles que lors de l'acquisition du phénotype cancéreux, les cellules devenaient résistantes à l'anoïkie (Simpson, C. D. *et al.*, 2008). Plusieurs formes de groupes de cellules vont être observées lors de l'invasion collective : un feuillet, une file, un tube ou une grappe. Ces groupements cellulaires vont être menés par une ou plusieurs cellules possédant les mêmes propriétés qu'une cellule isolée (dégradation de la MEC, traction par le cytosquelette...).

#### e) Intravasation, transport et extravasation

Après s'être détachées de la tumeur primaire, les cellules migrent vers les vaisseaux lymphatiques ou sanguins afin de se disperser vers différents sites secondaires. Il est établi que les étapes d'intravasation, de transport dans les fluides et d'extravasation sont limitantes dans la formation des métastases. Lors de ces différentes étapes, de nombreux partenaires et mécanismes moléculaires vont intervenir pour protéger les cellules de l'écoulement des fluides, pour entrer et sortir des vaisseaux. Par exemple, l'environnement sanguin avec les

forces de cisaillement dues au flux ou la présence du système immunitaire n'est pas favorable à la survie des cellules cancéreuses. Dans ce but, certains mécanismes se sont développés pour permettre aux cellules de résister à leur isolement dans le sang. Ainsi, le recrutement des plaquettes et leur agrégation autour des cellules cancéreuses leur confèrent une protection et augmentent la perméabilité vasculaire afin de faciliter leur sortie des vaisseaux (Figure 6) (Tsuruo, T. *et al.*, 2008; Gay, L. J. *et al.*, 2011).



**Figure 6. Schéma du mouvement des cellules tumorales du site de la tumeur primaire au site métastatique.**

1. Intravasation ; 2. Transport dans le flux sanguin sous la protection d'un agrégat plaquettaire ; 3. Extravasation.

#### f) Sites métastatiques

Les observations cliniques ont montré que chaque type de cancer présente des sites métastatiques préférentiels (pour revue (Chambers, A. F. *et al.*, 2002)). Il est admis que chez une patiente atteinte de cancer du sein, les sites secondaires les plus souvent colonisés sont les poumons, l'os, le foie et le cerveau. Concernant le site osseux, les conséquences sur la qualité de vie sont très importantes comme des douleurs extrêmement violentes, des fractures et une hypercalcémie. Le cancer colorectal est quant à lui connu pour cibler principalement le foie. Les mécanismes responsables du choix spécifique d'un tissu par une cellule cancéreuse comme site secondaire ne sont pas encore connus. La première théorie expliquant ce phénomène a été présentée à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle par Stephen Paget : il s'agit de la théorie

« seed and soil » (Paget, S. 1989). Elle est basée sur la relation qui existe entre la graine (la cellule cancéreuse) et le territoire (le site secondaire), c'est à dire que la cellule a les propriétés adaptées pour se développer dans un nouveau site qui possède les éléments pour l'accueillir. Cette théorie expliquerait que les sites de développement de métastases ne se fait pas de manière aléatoire.

g) Signatures métastatiques et facteurs favorisant la formation des métastases

(i) Approche génétique

Certaines équipes se sont attachées à dresser une liste de gènes présents dans les cellules ayant migré et s'étant installées dans un site secondaire. Cette liste détermine une signature métastatique. L'équipe de Joan Massagué a focalisé son intérêt sur le tropisme osseux de la lignée de cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 (Kang, Y. *et al.*, 2003). Ils ont mis en évidence au sein de cette population cellulaire originale, un sous groupe exprimant un ensemble de 11 gènes qui permettaient un ciblage spécifique de l'os pour la formation de métastases. Par une succession de passages *in vivo* et *in vitro*, en sélectionnant uniquement les cellules ayant métastasé dans l'os, ils ont affiné les déterminants essentiels à cette spécificité du développement osseux. Parmi ces 11 gènes, plusieurs codent pour des protéines sécrétées ou des récepteurs membranaires qui seront nécessaires à l'adaptation des cellules cancéreuses dans le tissu osseux. De plus, la véracité de cette étude était fondée sur des constats cliniques qui postulent que l'expression du gène CXCR4, connu pour être de mauvais pronostic, était impliqué dans la formation de métastases osseuses. En utilisant le même type d'approche, l'équipe de Massagué a par la suite mis en évidence des ensembles de gènes représentants des signatures métastatiques pour le poumon et le cerveau (Minn, A. J. *et al.*, 2005; Bos, P. D. *et al.*, 2009).

(ii) Approche mécanistique

D'autres équipes ont cherché à comprendre ce phénomène d'un point de vue mécanistique. L'étude de la vascularisation des principaux organes cibles pour les métastases a montré que les parois endothéliales ne présentaient pas les mêmes caractéristiques : par exemple, les capillaires sinusoides du foie sont fenestrés, ce qui facilite l'infiltration des cellules cancéreuses issues de carcinomes colorectaux (Paku, S. *et al.*, 2000). D'autre part,



l'expression de certaines molécules de surface soit au niveau des cellules tumorales soit au niveau des cellules endothéliales permet également un ciblage spécifique de certains tissus. Dans l'établissement de métastases pulmonaires durant la progression d'un cancer du sein, deux types d'interactions ont été mises en avant pour favoriser ce phénomène (Abdel-Ghany, M. *et al.*, 2001; Brown, D. M. *et al.*, 2004). Dans l'étude d'Abdel-Ghany (Abdel-Ghany, M. *et al.*, 2001), il a été montré que l'intégrine  $\beta_4$ , qui est souvent exprimée par les cellules cancéreuses mammaires, interagit avec un canal chlorure activé par le  $\text{Ca}^{2+}$  spécifiquement exprimé au niveau de l'endothélium pulmonaire. Dans la seconde étude, il s'agit d'une protéine exprimée uniquement à la surface des cellules cancéreuses mammaires, la métadherine, qui permet le ciblage spécifique du poumon (Brown, D. M. *et al.*, 2004).

En plus des protéines d'adhésion membranaires situées au niveau des vaisseaux, certains facteurs sécrétés par les sites métastatiques préférentiels participent également au ciblage. Il est connu que le tissu osseux sécrète beaucoup de CXCL12/SDF-1. Le récepteur de ce facteur est CXCR4 qui est exprimé dans les cellules cancéreuses mammaires (Kang, Y. *et al.*, 2003). L'attraction des cellules pour cet environnement est donc favorisée par le site lui-même.

Goldstein a mis en évidence un autre processus pouvant favoriser les métastases osseuses dues aux cellules cancéreuses mammaires (Goldstein, R. H. *et al.*, 2010). Les cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse (BMSC) sont connues pour migrer au niveau des tumeurs primaires. Quand ces BMSC sont au niveau du site la tumeur primaire, elles vont modifier différentes propriétés des cellules cancéreuses : prolifération et migration. Goldstein, en utilisant un modèle de xénogreffe orthotopique, a montré que les BMSC augmentaient la fréquence des métastases osseuses de cellules cancéreuses mammaires fortement métastasiées. Ce mécanisme serait dépendant de la sécrétion de l'IL-17B par les BMSC.

Un autre élément montrant l'implication de l'environnement dans la formation des métastases est l'utilisation de gènes communs à des signatures métastatiques pour différents organes (Hu, G. *et al.*, 2009). Des gènes de la signature métastatique nécessaires au ciblage du cerveau sont retrouvés dans celle permettant de cibler le poumon. Cette information suggère que les gènes ne sont pas suffisants à eux seuls pour fixer la spécificité du site et que l'environnement intervient également.

#### h) Développement temporel des métastases

Concernant le développement des métastases, un autre point fait actuellement débat. A quel moment les cellules s'échappent-elles du site primaire pour aller dans un site secondaire ? Si nous nous attachons à la description classique du développement de la pathologie cancéreuse, il semble que la formation des métastases soit un événement tardif dans l'étape de progression. En effet, la cellule doit acquérir un nombre important de modifications pour pouvoir réaliser l'ensemble des étapes décrites précédemment. Une étude parue récemment dans *Nature* montre que pour certains cancers, les cellules ayant formé les métastases sont des cellules qui ont subi une transformation progressive à partir des clones formant la tumeur primaire (Navin, N. *et al.*, 2011). Dans les cas cliniques utilisés pour cette étude, il n'existe pas de sous population située au niveau de la tumeur primaire présentant l'expression des mêmes gènes que les cellules ayant formé les métastases. Cela indique que les cellules qui ont métastasié dérivent de clones cellulaires issus de la tumeur primaire.

A l'opposé, il a été rapporté que certains patients présentent des métastases sans qu'aucune tumeur primaire ne soit détectée. Il a également été décrit des cas de patients recevant un greffon contenant des cellules cancéreuses d'un donneur supposé ne pas développer de pathologies et surtout de cancer (Riethmuller, G. *et al.*, 2001). Dans ces situations, des études concernant les aberrations chromosomiques montrent de fortes divergences entre les cellules retrouvées à des sites distants du site de la tumeur primaire (Schmidt-Kittler, O. *et al.*, 2003; Schardt, J. A. *et al.*, 2005). Ces résultats indiquent que les cellules qui métastasent peuvent acquérir les compétences nécessaires pour former des métastases avant que le diagnostic d'un cancer ne soit établi ou avant que le traitement de la tumeur primaire ne débute. Dans ce cas, la formation des métastases est très précoce. Il semble donc que l'échappement des cellules tumorales vers un site secondaire puisse se produire à différents moments en fonction de l'évolution de la tumeur primaire.

Ces informations concernant les métastases expliquent en partie les problèmes rencontrés en clinique pour lutter contre leur apparition et leur développement. En effet, le problème fondamental est le dépistage tardif de ces tumeurs secondaires. La compréhension des mécanismes favorisant la formation des métastases aura un impact majeur sur le développement de nouvelles thérapeutiques. A l'heure actuelle, les outils à la disposition des cliniciens dirigés contre les métastases ne sont pas forcément efficaces (composés anti-angiogéniques dirigés contre les intégrines) ou sont trop restreints. Certaines voies sont

cependant encourageantes comme l'utilisation des bisphosphonates dans le cas des métastases osseuses (Aft, R. 2011; Coleman, R. *et al.*, 2011). En effet, ces composés présentent l'avantage d'avoir, en plus d'inhiber la résorption osseuse, des propriétés inhibitrices de la croissance tumorale. Néanmoins la découverte de nouvelles cibles ou de composés ciblant des éléments connus pour intervenir dans la cascade métastatique sera importante pour l'avenir. De plus, l'utilisation des signatures métastatiques en tant qu'outil de diagnostic pourrait servir à enrayer la dispersion avant qu'elle n'ait lieu ou à développer des thérapies ciblées.

## II. Rôles des canaux potassiques dans le cancer : implication des canaux KCa

### A. Les canaux ioniques : généralités

#### 1. Introduction

Les canaux ioniques appartiennent à la famille des protéines membranaires transportant des ions comme les pompes ATPases ou les échangeurs. Il s'agit de protéines possédant la capacité de faire passer une ou plusieurs espèces ioniques au travers de la membrane de manière plus ou moins sélective. Il existe de nombreux canaux ioniques perméables au  $\text{Na}^+$ , au  $\text{K}^+$ , au  $\text{Ca}^{2+}$  ou bien encore au  $\text{Cl}^-$ . Ces protéines membranaires sont impliquées dans de nombreux phénomènes cellulaires aussi bien dans les cellules excitables, où elles permettent la formation et la propagation de potentiels d'actions, que dans les cellules dites « non excitables ». Par exemple, il a ainsi été montré que des canaux calciques intervenaient dans la régulation de la motilité des ostéoclastes et la résorption osseuse (Robinson, L. J. *et al.*, 2010). Certains canaux sont également impliqués dans les transports ioniques de l'intestin (Venkatasubramanian, J. *et al.*, 2010) ou bien encore dans l'activation ou la prolifération lymphocytaire (Panyi, G. *et al.*, 2003).

La fonction de ces protéines est dépendante de nombreux paramètres : le  $\text{Ca}^{2+}$ , le voltage, la sensibilité à un agoniste, à l'étirement, leur nombre et leur localisation à la membrane ainsi que les voies de signalisation les régulant. Une altération de l'expression ou de la fonction des canaux va entraîner une canalopathie comme par exemple la mucoviscidose (conductance chlore) ou différentes neuropathies (pour revue (Kullmann, D. M.)).

#### 2. Classification des canaux ioniques

Les canaux ioniques se différencient par leurs gènes, leurs structures, leurs propriétés électrophysiologiques, leurs pharmacologies, leurs régulations, leurs mécanismes d'ouverture et leurs spécificités envers un ion. Concernant les mécanismes d'activation des canaux ioniques, ils peuvent être dépendants du voltage, du pH, de la liaison d'un ligand ou bien être

mécanosensibles. Selon la base de données IUPHAR (<http://www.iuphar.org/>), la superfamille des canaux sensibles au voltage peut être sous divisée en 10 groupes (Harmar, A. J. *et al.*, 2009). La description de ces différentes familles est basée sur les différents motifs structuraux constituant les sous-unités  $\alpha$  ainsi que leur sélectivité envers un ion (pour revue (Yu, F. H. *et al.*, 2005)). La diversité de cette grande famille de protéines est encore accrue par la possibilité que possèdent les sous unités  $\alpha$  de s'associer entre elles et former des hétéromères. De plus, l'existence de sous unités  $\beta$  qui s'associent avec les sous-unités  $\alpha$  augmentent encore le nombre de possibilités (exemple des sous unités  $\beta 1-4$  pour les canaux sodiques voltage dépendants).

### 3. Sélectivité des canaux ioniques

Les caractéristiques principales des canaux ioniques sont leur sélectivité et leur conductance. La compréhension de ces mécanismes est en pleine évolution. En effet, il s'agit de 2 fonctions a priori non compatibles. Une grande sélectivité nécessite la formation d'interactions spécifiques de haute énergie ce qui est peu favorable à un haut débit de passage ( $10^6$  à  $10^8$  ions par seconde pour les canaux ioniques). L'une des premières études concernant la sélectivité a été menée par Lise Heginbotham en 1994 sur le canal potassique de type Shaker (Heginbotham, L. *et al.*, 1994). Ils ont mis en évidence une « séquence signature » du pore et du filtre de sélectivité pour la spécificité envers le  $K^+$  et ils ont présenté les éléments minimums pour conserver cette sélectivité. Il s'agit d'une séquence de huit acides aminés (TXXTXGYG) située au niveau du segment S5-S6, c'est à dire de la région du pore du canal. Suite à ces premiers travaux, l'obtention de la structure du canal KcsA, et en particulier de la région du pore, par l'équipe de R. MacKinnon (Doyle, D. A. *et al.*, 1998), a permis une caractérisation plus rapide des autres protéines membranaires. Ces travaux indiquent que le pore des canaux potassiques et le filtre de sélectivité sont très courts. Ceci permet de minimiser la distance durant laquelle les ions interagissent fortement avec le canal et de maintenir ainsi un trafic élevé. De plus, la présence de deux ions  $K^+$  au sein du filtre entraîne une force de répulsion qui amplifie la vitesse de passage. Actuellement, les travaux s'attachent à déterminer les paramètres différenciant la sélectivité entre les ions  $Na^+$  et  $K^+$ . De nouveaux éléments ont été apportés par la cristallisation d'un canal perméable au  $Na^+$  et au  $K^+$  de *Bacillus cereus* (Shi, N. *et al.*, 2006). Cette étude démontre que le filtre de sélectivité du canal est perméable au  $Na^+$  et au  $K^+$  car il est plus souple que celui du canal KcsA. Cela indique que la différence de taille entre les deux ions hydratés est tolérée par le canal de

Bacillus cereus à la différence du KcsA. Ces informations nous indiquent que la structure du filtre est impliquée dans la sélectivité d'un canal en plus du degré d'hydratation de l'ion.

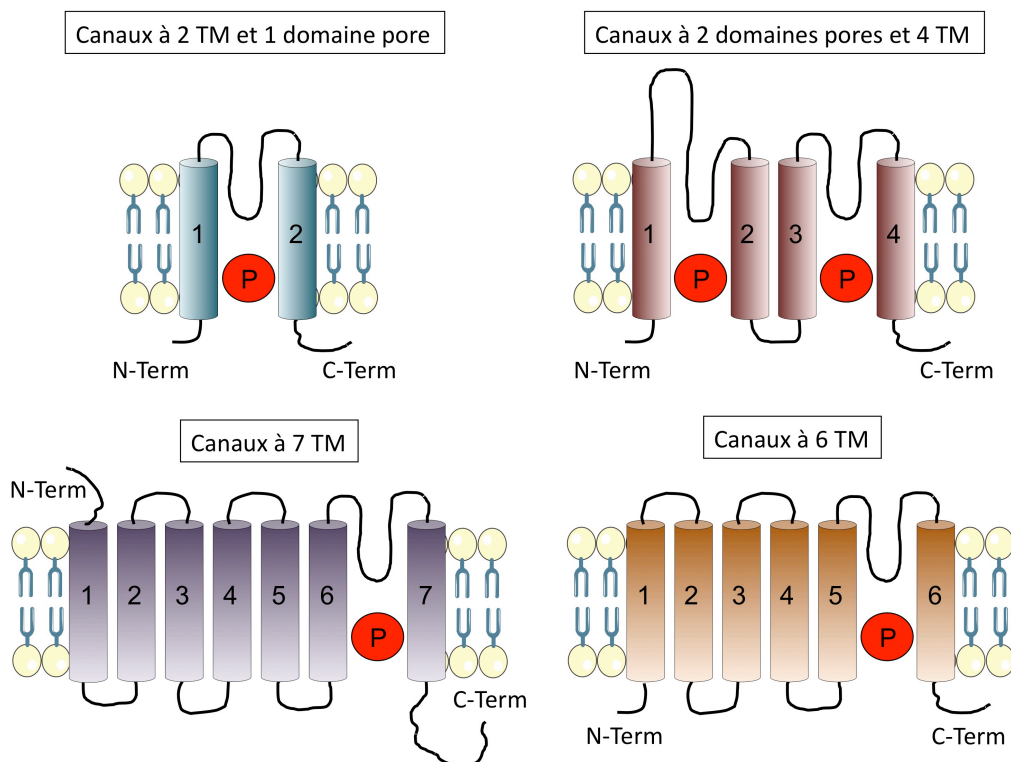
#### 4. Les canaux potassiques

Au sein de la famille des canaux ioniques, les canaux potassiques sont les représentants les plus nombreux et les plus variés. Ils sont répartis de manière ubiquitaire au sein de l'organisme et régulent de très nombreuses fonctions. Par exemple, au niveau du tissu nerveux, ils contrôlent l'excitabilité des cellules capables de générer un potentiel d'action alors que dans les cellules dites « non excitables », ils vont intervenir dans les phénomènes d'homéostasie potassique, dans le contrôle du potentiel membranaire et du volume cellulaire ou bien encore dans la sécrétion de différents composés. Le grand nombre de gènes codant pour ces protéines (<http://www.ipmc.cnrs.fr/~duprat/ipmc/nomenclature.htm#debut>) est corrélé aux multiples fonctions que ces canaux potassiques régulent. Ces canaux possèdent des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques singulières par rapport aux autres canaux. D'un point de vue structural, les canaux potassiques ont été regroupés en une superfamille définie par l'homologie d'une grande part de leur séquence en acides aminés et par la présence d'un motif hautement conservé formant le pore du canal. Ce motif participe à la formation du filtre de sélectivité permettant la reconnaissance très précise d'un ion  $K^+$  (comme décrit précédemment dans le chapitre Généralités des Canaux Ioniques).

En fonction de l'homologie de séquence en acides aminés des différentes sous-unités, la famille des canaux potassiques a été divisée en 4 groupes (Gutman, G. A. *et al.*, 2003)(Figure 7) :

- Les canaux à 2 segments transmembranaires (TM) et 1 domaine pore. Cette catégorie regroupe les canaux potassiques rectifiant dans le sens entrant ( $K_{ir}$  : inward rectifier), les canaux sensibles à l'ATP ( $K_{ATP}$ ) et les canaux couplés aux petites protéines G (GIRK). Ils formeront des complexes fonctionnels sous la forme de tétramères. Les extrémités N et C terminales sont cytoplasmiques. Le pore est formé par la séquence située entre les 2 domaines transmembranaires.
- Les canaux à 2 domaines pores et 4 TM. Il s'agit de 2 motifs à 2 TM contenant chacun un domaine pore et qui sont liés en tandem. Ces protéines sont fonctionnelles en formant des dimères.

- Les canaux à 7 TM. Cette famille forme le groupe des canaux de grande conductance activés par le calcium nommé BKCa (B pour Big ; appelé aussi MaxiKCa). La boucle formant le pore se situe entre les segments transmembranaires 6 et 7 et à la différence des autres familles, l'extrémité N-terminale se situe en extracellulaire. Il forme un canal fonctionnel sous la forme de tétramère.
- Les canaux à 6 TM. Ce groupe rassemble les canaux voltage dépendants (Kv) ainsi que les canaux activés par le calcium (KCa) de petite conductance (SKCa, Small conductance calcium activated potassium channel) et de conductance intermédiaire (IKCa, Intermediate conductance calcium activated potassium channel). Les extrémités N- et C-terminales de cette famille sont situées au niveau intracellulaire et la région formant le pore se situe entre les segments 5 et 6. L'association en tétramère donnera un canal fonctionnel.



**Figure 7. Quatre groupes structuraux des canaux potassiques.**

TM = segment transmembranaire ; 1,2,3,4,5,6,7 : numéro TM ; P = domaine pore.

## B. Les canaux KCa

Les canaux KCa regroupent les canaux BKCa, IKCa et SKCa. Dans le cadre de notre projet, nous nous sommes principalement intéressés aux canaux SKCa et IKCa. Je porterai donc une

attention particulière à ces deux groupes et je ne m'attacherai pas à décrire précisément les fonctions du canal BKCa.

## 1. Historique des canaux SKCa

C'est en caractérisant la phase d'hyperpolarisation des potentiels d'action que les canaux SKCa ont été mis en évidence. Cette période également dénommée la phase « d'afterhyperpolarization » (AHP) peut durer jusqu'à plusieurs secondes et permet la régulation de l'excitabilité des neurones. L'AHP présente plusieurs composantes temporelles qui sont générées par différents KCa qui possèdent des propriétés électrophysiologiques et des pharmacologies singulières (Moolenaar, W. H. *et al.*, 1979).

Le premier canal participant à ce phénomène de contrôle est le BKCa (Marty, A. 1981). Il s'agit de la famille des canaux à 7 TM présentés précédemment (Figure 7). Ces canaux sont sensibles au voltage (activés par la dépolarisation) et activés par des concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires supérieures à celles nécessaires à l'activation des SKCa et du IKCa. Le BKCa participe à la phase précoce et rapide de l'AHP. Suite à la phase de dépolarisation du potentiel d'action, la membrane est suffisamment dépolarisée pour activer les BKCa et la charge en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (liée à l'activation des canaux calciques dépendants du voltage) est suffisamment importante pour amplifier leur activation. Lors de l'activation des BKCa, la membrane s'hyperpolarise et les mécanismes de régulation de la concentration calcique intracellulaire entrent en jeu favorisant la fermeture de ces canaux. En raison de ces paramètres (activation par la dépolarisation et par l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$ ), les canaux BKCa ne pourront pas participer à la phase plus tardive de l'AHP.

Les études décrivant la composante plus lente et plus tardive de l'AHP ont mis en évidence d'autres KCa qui la régulent. Une approche pharmacologique a montré que cette phase plus lente de l'AHP présente 2 composantes : une phase sensible à l'apamine et l'autre non. De nombreuses études se sont intéressées à l'effet de cette toxine dans différents types cellulaires du système nerveux central comme par exemple les cellules de neuroblastomes (Hugues, M. *et al.*, 1982). Nous reviendrons sur l'implication des canaux SKCa dans l'AHP dans le cadre de leur étude fonctionnelle (paragraphe « Rôles physio-pathologiques des canaux SKCa », page 79)



## 2. Gènes, structures et propriétés électrophysiologiques des canaux

### SKCa

Les canaux ioniques sont composés de différents types de sous-unités : les sous-unités  $\alpha$  principales formant le pore du canal et les sous-unités  $\beta$  régulatrices. Pour la description des canaux SKCa, nous nous intéresserons uniquement aux sous-unités  $\alpha$  les composant. A l'heure actuelle, aucune sous-unité  $\beta$  n'a été décrite pour les canaux SKCa.

#### a) Gènes, protéines et isoformes

##### (i) Les gènes

Suite à la mise en évidence des SKCa, la structure moléculaire de ceux-ci a été découverte par l'équipe de John Adelman. Les SKCa ont été clonés et caractérisés en 1996 (Kohler, M. *et al.*, 1996). A partir d'une homologie de la séquence codant pour le pore des Kv, des sondes nucléiques ont été utilisées pour tester la présence de ces canaux dans les bases de données. Il a ainsi été mis en évidence 3 séquences complètes codant pour les canaux SKCa (Figure 10). Les dénominations utilisées pour ces canaux sont basées sur 2 nomenclatures officielles : IUPHAR et HGNC (<http://www.genenames.org/>) (Tableau 1). Il est important de noter que le IKCa est souvent inclus dans la famille des SKCa car il possède des homologies de séquence et de fonction.

IUPHAR	HGNC	Autres
KCa1.1	KCNMA1	BKCa, maxiKchannel
KCa2.1	KCNN1	SKCa1, hSK1, SK1
KCa2.2	KCNN2	SKCa2, hSK2, SK2
KCa2.3	KCNN3	SKCa3, hSK3, SK3
KCa3.1	KCNN4	SKCa4, hSK4, SK4, IKCa1, IK1

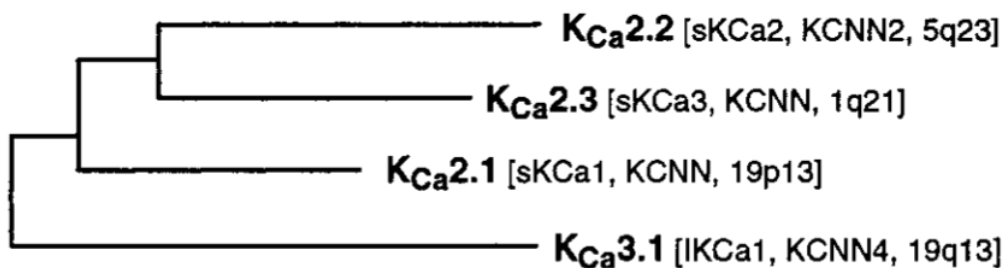
**Tableau 1. Nomenclature des canaux KCa.**

Les nomenclatures IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology) et HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) sont utilisées officiellement. La nomenclature HGNC correspond au nom des gènes. Les autres nomenclatures correspondent aux divers noms donnés aux protéines.

Les 3 gènes codant pour ces sous unités ont été dans un premier temps clonés chez l'Homme (hSK1) et le rat (rSK2 et rSK3). Par la suite, il est apparu que la protéine SK1 du rat n'était pas pleinement fonctionnelle. La localisation des gènes codant pour les différents canaux de la

famille des SKCa chez l'Homme est la suivante : locus 19p13.1 pour SK1, locus 5q23.3 pour SK2 et locus 1q21.3 pour SK3. Il existe entre 70 % et 80 % d'homologie au niveau de la séquence d'acides aminés entre les 3 sous unités  $\alpha$ . *A contrario*, il y a moins de 15 % d'homologie avec les sous unités  $\alpha$  du canal BKCa et 40 % à 50 % avec la sous unité  $\alpha$  du canal IKCa. Ce faible pourcentage justifie que l'on ne l'inclut pas dans la famille des SKCa.

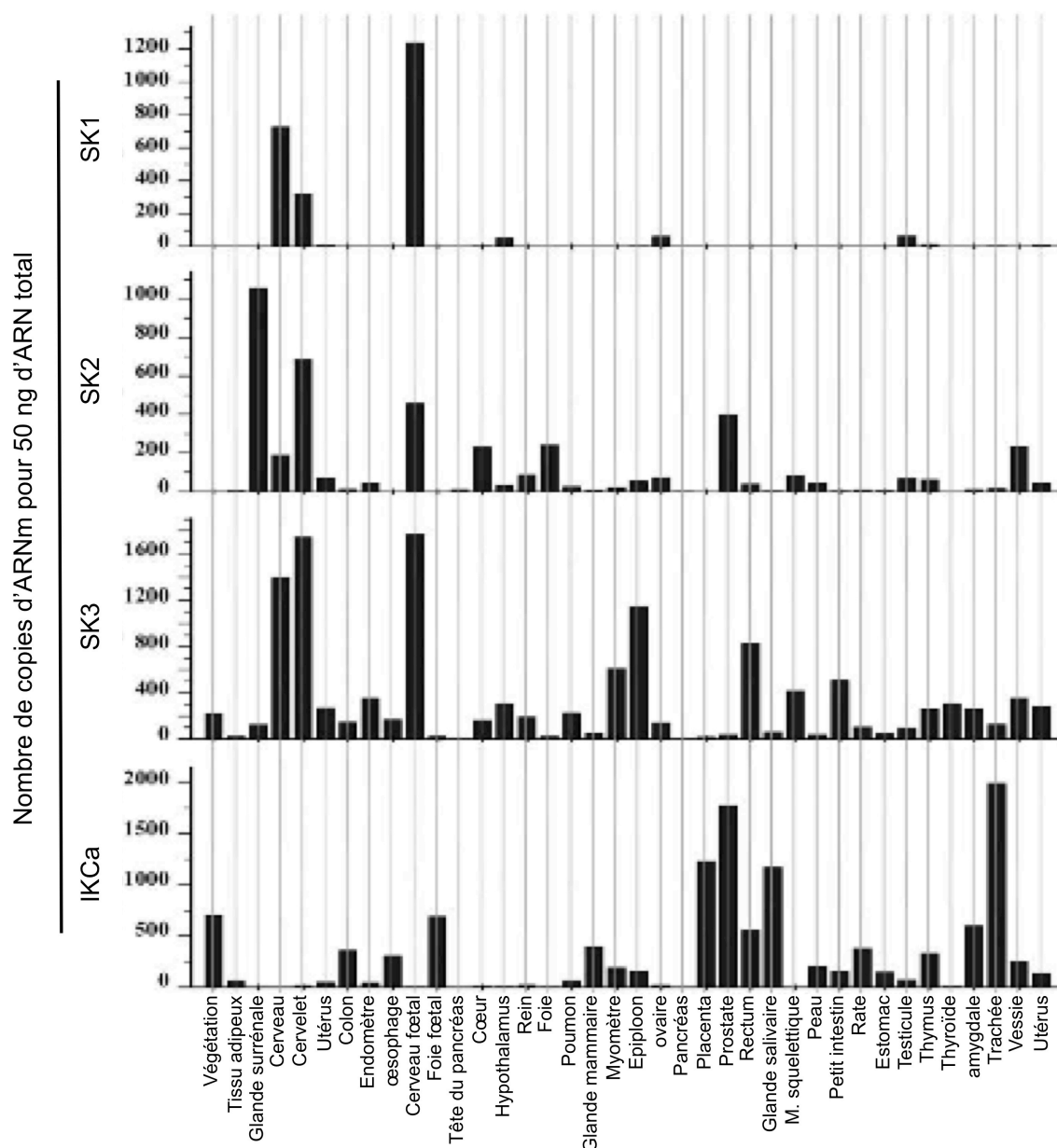
Si nous nous intéressons de plus près au gène codant pour chaque sous unité  $\alpha$  des SKCa, il a été rapporté que le gène KCNN1 comporte 11 exons alors que les gènes KCNN2 et KCNN3 n'en comportent que 8. L'observation de ces gènes au travers de différentes espèces indique une forte conservation de la séquence. Ainsi, il existe 84 % d'homologie entre la forme humaine et celle du rat pour le SK1 (D'Hoedt, D. *et al.*, 2004), 97,6 % pour le SK2 (Desai, R. *et al.*, 2000) et 94,4 % pour le SK3 (Joiner, W. J. *et al.*, 1997) (Figure 8). Il est également intéressant de noter que la structure génomique est très proche entre celles des gènes codant les sous-unités  $\alpha$  des SKCa et celle du gène codant pour le canal IKCa (Ghanshani, S. *et al.*, 2000). Ceci semble indiquer une origine commune pour ces différents gènes (Figure 8).



**Figure 8. Arbre phylogénétique de la famille des canaux SKCa et IKCa.**  
D'après Gutman *et al.*, 2003.

L'expression des ARNm codant pour les 3 sous unités  $\alpha$  est corrélée à l'existence de courants KCa définissant ainsi des canaux fonctionnels. Différents travaux ont présenté très précisément la localisation de ces sous unités dans les cerveaux de rat et de souris (Rimini, R. *et al.*, 2000; Stocker, M. *et al.*, 2000; Sailer, C. A. *et al.*, 2004). Cependant, peu d'études se sont intéressées à montrer un profil d'expression global chez l'Homme en dehors du système nerveux central. Les travaux de M.X. Chen présentent l'expression des ARNm codant pour les 3 sous unités  $\alpha$  des SKCa ainsi que pour le canal IKCa sur un large panel de tissus humains ainsi que leurs expressions protéiques au niveau du colon et du corps caverneux (Chen, M. X. *et al.*, 2004)(Figure 9). Cette étude montre que le canal SK1 est exprimé uniquement au niveau des neurones à la différence des canaux SK2 et SK3 qui sont présents

dans la majorité des tissus. L'ARNm codant pour le SK3 est le plus ubiquitaire. Le seul tissu testé où cet ARNm est absent est le pancréas, ce qui est étonnant car il est exprimé dans les cellules  $\beta$  (Tamarina, N. A. *et al.*, 2003). A l'opposé le canal IKCa est totalement absent du système nerveux central. Les résultats présentés dans cette étude sont concordants avec les données issues des autres espèces. Il a également été rapporté une expression du canal SK1 en dehors du système nerveux central dans le pancréas de rat (Andres, M. A. *et al.*, 2009) ou bien encore au niveau du cœur (Homme et souris) (Tuteja, D. *et al.*, 2005; Tuteja, D. *et al.*, 2010).



**Figure 9. Expression tissulaire des ARNm codant pour les canaux SK1-3 et IKCa.**  
Modifié d'après Chen *et al.*, 2004.

## (ii) Les protéines endogènes et les isoformes

Les sous-unités  $\alpha$  de SK1, SK2 et SK3 formant des canaux fonctionnels possèdent respectivement 543, 579 et 736 acides aminés. Comme indiqué précédemment, les séquences codantes pour les segments transmembranaires des 3 sous-unités présentent entre 80 % et 90 % d'homologie. La conservation de la séquence est encore plus importante au niveau des acides aminés formant le pore des protéines SK2 et SK3. Seulement deux acides aminés sont différents : Ala 331 et Asn 367 de SK2 correspondent à Val 485 et His 521 de SK3. A l'opposé, les extrémités N- et C-terminales sont moins conservées entre ces trois sous-unités. Elles varient de manière importante en longueur et en séquence (Kohler, M. *et al.*, 1996). La cristallisation des premiers canaux ioniques a entraîné de nombreuses études de modélisation. Concernant les canaux SKCa, la modélisation a concerné les segments S5/pore/S6 des canaux hSK2 et hSK3 (Andreotti, N. *et al.*, 2005). Ces études ont été réalisées dans le but de comprendre les interactions existantes entre ces canaux et certaines toxines afin de produire des inhibiteurs spécifiques de chaque sous-unité  $\alpha$ . Il a été montré que le motif RXCQ présent sur les toxines actives sur les canaux SKCa est nécessaire mais pas suffisant pour l'interaction avec ceux-ci. D'autre part, les acides aminés situés à l'extérieur du pore ne sont pas les mêmes entre SK2 et SK3 (Asn et His respectivement). Cette variation de charge (neutre pour Asn et basique pour His) modifie les interactions électrostatiques entre le canal et les toxines, ceci pouvant être à l'origine des sensibilités différentes pour ces inhibiteurs. Ces informations vont permettre de synthétiser de nouveaux composés plus sélectifs.

### ⇒ Variants de SK1

L'expression de la sous-unité SK1 murine se fait selon une transcription très complexe (Shmukler, B. E. *et al.*, 2001). Il existerait 16 variants d'épissage conduisant à des protéines différentes. Chez l'Homme, l'expression semble moins complexe mais il existe quand même 4 variants d'épissage en plus de la forme fonctionnelle (Kohler, M. *et al.*, 1996). En 2001, 3 variants d'épissages tronqués dans leur partie C-terminale et plus précisément sur le site de fixation de la CaM ont été décrits dans des réticulocytes, des cellules leucémiques et au niveau de l'hippocampe (Zhang, B. M. *et al.*, 2001). La dernière forme a été détectée dans le cerveau de fœtus humain et elle posséderait 18 acides aminés en plus. La séquence de ce variant a été soumise aux bases de données en 2005 par Tagaya (<http://www.uniprot.org/> ; réf. 92952).

### ⇒ Variants de SK2

Pour le canal SK2, deux variants en plus de la forme fonctionnelle (SK2-Std) ont été mis en évidence : une forme longue et une forme courte.

La forme la plus longue comportant 275 acides aminés supplémentaires a été découverte chez la souris (Strassmaier, T. *et al.*, 2005). Cette isoforme, nommée SK2-L, est exprimée au niveau du cerveau de souris de façon similaire à la forme native (SK2-Std). SK2-L est également capable de former des canaux fonctionnels dans un système d'expression tel que les cellules COS. Elle s'associe de manière endogène aux autres sous unités et particulièrement SK3. De plus, l'allongement de l'extrémité N-terminale de ce variant présente de nouveaux sites de régulation potentiels (sites de phosphorylation) et semble moduler l'adressage du canal à la membrane plasmique. Par immunocytochimie, il a été montré que SK2-std présente une répartition homogène autour de la cellule alors que SK2-L présente une expression très focalisée, en points définis sur la membrane cellulaire.

Par la suite, S. Murthy et ses collaborateurs ont découvert l'existence d'une forme plus courte de 140 acides aminés (Murthy, S. R. *et al.*, 2008). Cette forme appelée SK2-sh a été mise évidence chez l'Homme, le rat et la souris. Cette diminution de longueur est due à la disparition des segments S3, S4 et S5, cependant la région pore, le CaMBD et les domaines « coiled coil » sont conservés. Cette protéine ne semble pas former de canaux fonctionnels mais elle ne joue pas le rôle d'un dominant négatif envers la forme SK2-Std. Son profil d'expression au niveau du cerveau de souris est différent des autres sous unités SKCa et particulièrement de SK2-Std, ce qui peut sous-entendre une régulation différente au niveau du promoteur. Elle est moins exprimée que la forme fonctionnelle en condition physiologique. L'expression de SK2-sh est augmentée dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Murthy, S. R. *et al.*, 2008). Cependant, le rôle précis de cette protéine n'est pas encore décrit.

### ⇒ Variants de SK3

Le canal SK3 présente au moins 5 isoformes. Très rapidement après le clonage de la forme fonctionnelle, des variants d'épissages ont été découverts (Chandy, K. G. *et al.*, 1998). La sous-unité SK3 est la seule à présenter deux motifs polyglutamines de longueurs variables au niveau de son extrémité N-terminale. La présence de ces motifs ainsi que la localisation chromosomique de son gène (locus 1q21.3) ont fait de cette protéine un acteur potentiel de la

schizophrénie. Il est connu que l'expansion de certains motifs polyglutamines est impliquée dans la schizophrénie. D'autre part, la localisation chromosomique du gène se situe dans une région associée aux troubles neurologiques (Rosa, A. *et al.*, 2002).

Il a été mis en évidence une forme tronquée de la sous-unité SK3 chez un patient schizophrène (Bowen, T. *et al.*, 2001). Cette forme particulière, appelée SK3 $\Delta$ , a été étudiée de manière approfondie bien qu'elle n'ait été retrouvée que chez un seul patient. Il s'agit d'une protéine correspondant à la partie N-terminale du canal SK3, qui compte 285 acides aminés et qui ne peut pas former de canal fonctionnel (Miller, M. J. *et al.*, 2001). Cette forme tronquée peut intervenir en tant que dominant négatif et est capable de retenir au niveau intracellulaire les sous-unités SK2 et SK3.

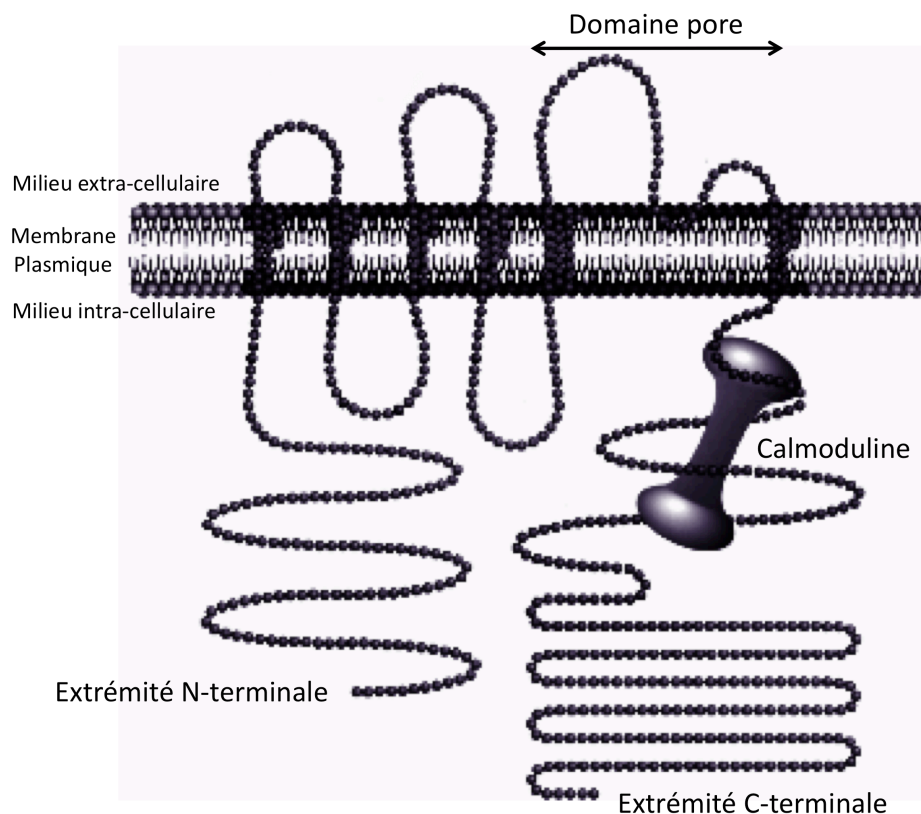
Par la suite, deux autres isoformes du canal SK3 ont été décrites (Tomita, H. *et al.*, 2003; Kolski-Andreaco, A. *et al.*, 2004). Il s'agit de protéines issues d'épissages alternatifs de l'exon 1 de la forme native. Ces variants, nommés SK3-1B et SK3-1C, ne forment pas de canaux fonctionnels. SK3-1B possède 418 acides aminés et est retrouvé dans l'ensemble des tissus où est exprimée la protéine SK3 fonctionnelle (Tomita, H. *et al.*, 2003). A l'opposé, SK3-1C, qui contient 427 acides aminés, n'est retrouvée que dans les tissus périphériques (Kolski-Andreaco, A. *et al.*, 2004). SK3-1B et SK3-1C sont des dominants négatifs envers toutes les sous-unités SKCa. SK3-1C est également capable de retenir les sous-unités IKCa au niveau intracellulaire.

En 2004, Wittekindt et ses collaborateurs ont mis en évidence une nouvelle isoforme de la protéine, hSK3\_ex4 (Wittekindt, O. H. *et al.*, 2004). Cette isoforme a été découverte dans du tissu embryonnaire humain et elle possède une quinzaine d'acides aminés supplémentaires situés entre le cinquième segment transmembranaire et la région pore. L'insertion de ces résidus n'affecte pas la fonction du canal mais entraîne des modifications des propriétés pharmacologiques du canal. En effet, hSK3\_ex4 présente une sensibilité fortement diminuée à différents bloqueurs spécifiques des SKCa : l'apamine, la scyllatoxine et la D-tubocurarine. Il est intéressant de noter que cette protéine est exprimée de manière très large mais dans un rapport de 0 à 2 % comparé à la forme standard. Ceci peut avoir comme conséquence de modifier la pharmacologie des canaux SK3 dans les différents tissus.

## b) Structure des canaux SKCa

### (i) Généralités

Les canaux dont les protéines sont codées par les gènes KCNN1-3 appartiennent à la famille des canaux à 6 TM et 1 domaine pore (Figure 10) (Gutman, G. A. *et al.*, 2003). Les extrémités N- et C-terminales sont situées au niveau intracellulaire. Ces deux extrémités sont les parties les moins conservées vis-à-vis des autres canaux potassiques. Afin de former un canal fonctionnel, les sous-unités  $\alpha$  doivent s'associer afin de former des tétramères. Le recouvrement des profils d'expression des différentes sous-unités permet de supposer qu'il existe des associations entre les sous unités SK1, SK2 et SK3.



**Figure 10. Structure des canaux SKCa.**

Les canaux SKCa possèdent 6 TM et leurs extrémités N- et C-terminales sont situées au niveau intra cellulaire. La calmoduline se fixe au niveau de l'extrémité C-terminale. La sensibilité à l'apamine est liée à différents acides aminés situés au niveau de la boucle S3-S4 et au niveau des segments S5-S6 mais en dehors du pore. Modifié d'après Bond *et al.*, 1999, Annals New York Academy of Science.

### (ii) Associations des sous unités

Depuis 1997, il est admis que des assemblages sous forme d'homo- ou d'hétérotétramères peuvent exister. La première démonstration a été faite pour SK1 et SK2 dans un système d'expression, les ovocytes de Xénope (Ishii, T. M. *et al.*, 1997). Par la suite différentes études

sont revenues sur cette association mais peu de travaux ont relaté les interactions possibles avec SK3. En 2001, il a été démontré une association des sous-unités SK2 avec SK3 (Miller, M. J. *et al.*, 2001). L'isoforme de SK3 présentée dans cette étude est codée par un gène muté possédant une délétion de quatre paires de bases. Cette protéine a été découverte chez un patient atteint de schizophrénie (Bowen, T. *et al.*, 2001). La conséquence de ce décalage du cadre de lecture est une protéine tronquée. Ce fragment correspondant à la partie N-terminale de la protéine native et agit en tant que dominant négatif. Dans les cellules JURKAT, exprimant de manière endogène le canal SK2 fonctionnel, la surexpression de cette isoforme de SK3 entraîne la disparition du courant SK2 intrinsèque. Cette première démonstration de l'interaction entre SK2 et SK3 a néanmoins été remise en cause par Sailer et ses collaborateurs qui n'ont pas réussi à co-immunoprécipiter les 2 partenaires sur des extraits protéiques issus du système nerveux central (Sailer, C. A. *et al.*, 2002).

Ultérieurement, il a été montré dans les cellules HEK293 la possibilité que la protéine SK3 interagisse avec les protéines SK1 et SK2 (Monaghan, A. S. *et al.*, 2004). L'utilisation de mutants de la protéine SK3 (insensible à l'apamine) a permis de montrer l'association des sous-unités SK2 et SK3 pour former des canaux fonctionnels. Plus tard, la mise en évidence d'une nouvelle isoforme de SK2 a montré à nouveau que SK2 pouvait s'associer avec SK3 (Strassmaier, T. *et al.*, 2005). L'étude de Monaghan montre également que les sous unités SK1 peuvent s'associer à SK3 (Monaghan, A. S. *et al.*, 2004). La co-expression de la sous-unité hSK1 avec la protéine rSK3 entraîne la disparition complète du courant porté par le canal SK3 fonctionnel. L'utilisation de rSK1 cause également une diminution mais moins drastique. Pour expliquer cette inhibition du courant, l'équipe de Guy Moss a utilisé la microscopie confocale afin d'observer la localisation de la protéine SK3. Quelle que soit l'origine de la protéine SK1 (rat ou humain), la protéine SK3 est retenue au niveau intracellulaire.

Récemment, il a été montré au niveau cardiaque que les hétéromères entre les 3 sous unités pouvaient se former de manière endogène aussi bien chez l'Homme que chez la souris (Tuteja, D. *et al.*, 2010). La formation de ces hétérotétramères se fait par les domaines « coiled-coil » situés au niveau de l'extrémité C-terminale. Ces domaines sont du type « Leucine Zipper » et ont été cristallisés lors d'une étude précédente. Cependant leur importance fonctionnelle n'avait pas encore été démontrée (Kim, J. Y. *et al.*, 2008).



### (iii) Mécanismes d'associations des sous unités $\alpha$

Il est connu que l'extrémité N-terminale des Kv, avec la séquence « T1 », participe à l'association des sous-unités  $\alpha$  et à l'adressage des canaux à la membrane (Tu, L. *et al.*, 1996). Pour d'autres canaux potassiques (hERG, BKCa), c'est l'extrémité C-terminale avec le domaine RCK, qui remplit ces fonctions (Kupersmidt, S. *et al.*, 1998; Jiang, Y. *et al.*, 2001).

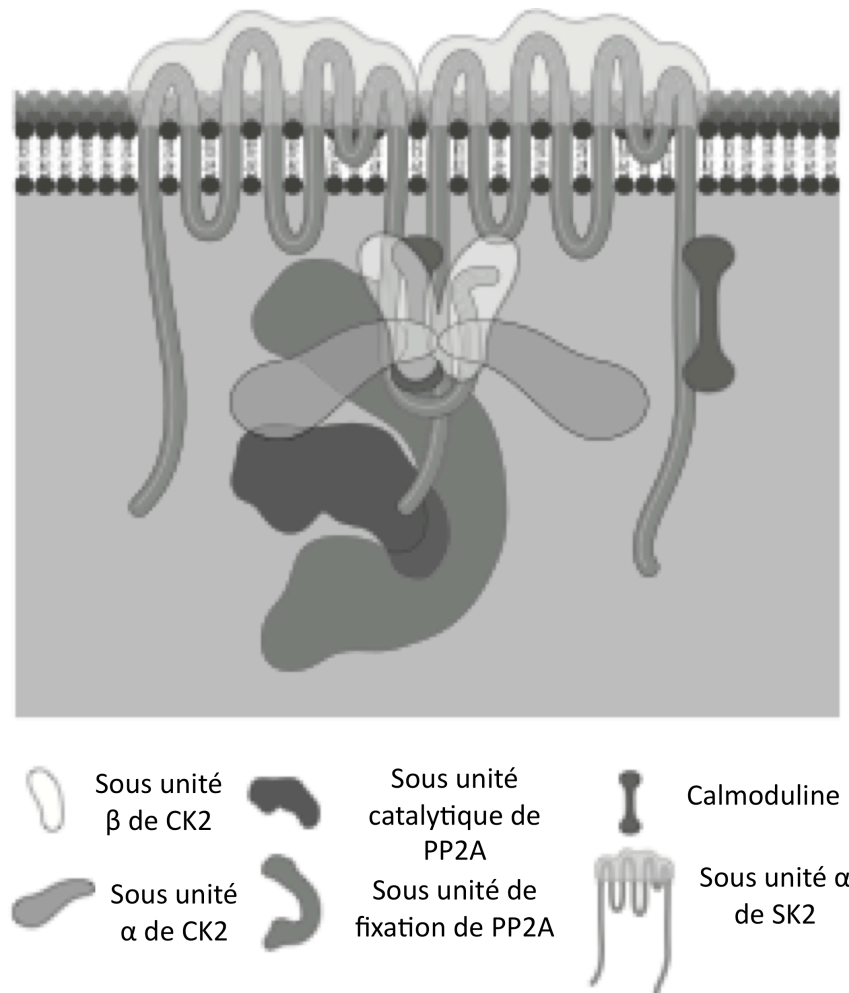
Les canaux SKCa et IKCa ne possèdent pas les mêmes séquences (T1 ou RCK) que celles décrites pour les Kv ou BKCa. En 2001, Joiner a montré que la calmoduline (CaM) et son domaine de fixation à la sous-unité  $\alpha$  de IKCa intervenait dans les fonctions d'association et d'adressage à la membrane (Joiner, W. J. *et al.*, 2001). Les interactions entre la CaM et les canaux SKCa ont été beaucoup étudiées.

La fixation constitutive de la CaM à la sous-unité  $\alpha$  des canaux SKCa, qui n'est pas dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , est un élément important pour l'adressage de SK2 à la membrane plasmique (Lee, W. S. *et al.*, 2003). Ceci indique que cette fixation peut intervenir lors du « processing » des canaux. Les domaines de fixation étant très conservés chez les SKCa, cela suggère qu'il s'agit d'un mécanisme commun pour SK1, 2 et 3. Ces données indiquent également que la CaM peut être un facteur limitant du nombre de canaux adressés à la membrane. Néanmoins le domaine de fixation à la CaM ne serait pas suffisant pour la tétramérisation et l'adressage à la membrane des canaux SKCa. En effet, d'autres séquences situées aux extrémités N- et C-terminales de la protéine SK3 permettent ces associations entre sous-unités  $\alpha$  (Roncarati, R. *et al.*, 2005; Decimo, I. *et al.*, 2006). Des séquences de type « Coiled Coil » ou « leucine zipper » seraient impliquées dans l'association des sous-unités  $\alpha$  des SKCa et leur adressage membranaire. De nouveaux mécanismes sont mis à jour progressivement. Il a ainsi été montré que la localisation membranaire du canal SK2 pouvait être régulée par son état de phosphorylation (Ren, Y. *et al.*, 2006). La protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique peut phosphoryler ce canal au niveau des sérines 568, 569 et 570 et entraîner sa rétention au niveau intracellulaire. Ce phénomène participerait à la potentialisation à long terme liée au récepteur à NMDA (Lin, M. T. *et al.*, 2008). L'ensemble de ces mécanismes indique la complexité de la régulation de cette famille de canaux et montre qu'il reste encore de nombreuses voies à explorer.

### (iv) Partenaires protéiques des sous-unités $\alpha$

Certaines protéines intracellulaires autre que la CaM peuvent se fixer au canal SK2 et former un complexe multiprotéique (Figure 11). La caséine kinase 2 (CK2) et la protéine phosphatase

2A (PP2A) sont les premiers partenaires de SK2 à avoir été décrits (Bildl, W. *et al.*, 2004). Ces travaux indiquent que les sites de fixation de la CK2 et des sous-unités régulatrices de la PP2A sont répartis sur différentes séquences intracellulaires de SK2. L'association de la PP2A à la sous-unité  $\alpha$  de SK2 semble labile car elle n'est pas retrouvée au niveau cellulaire.



**Figure 11. Complexe multiprotéique environnant de SK2.**

Modifié d'après Allen D. *et al.*, The Journal of Neuroscience, 2007.

Il est intéressant de voir que dans certains systèmes cellulaires particuliers, d'autres protéines peuvent interagir avec les canaux SK2. Dans les cardiomyocytes, le canal SK2 est en interaction directe avec l' $\alpha$ -actinine 2, une protéine du cytosquelette (Lu, L. *et al.*, 2007). Ce couplage permet le rapprochement physique d'une source de  $\text{Ca}^{2+}$  et le canal SK2. Par la suite, les interactions entre ces 2 protéines ont été précisées (Lu, L. *et al.*, 2009). L'interaction entre le canal SK2 et l' $\alpha$ -actinine 2 se fait par l'intermédiaire des domaines « EF-Hand » sur l' $\alpha$ -actinine 2 et le domaine de fixation à la CaM sur le canal SK2. En plus de maintenir le

canal SK2 auprès de la source de  $\text{Ca}^{2+}$ , l'interaction avec l' $\alpha$ -actinine 2 permet également de retenir le canal au niveau de la membrane.

#### (v) Segment S4 et sensibilité au voltage

Les canaux SKCa possèdent comme les canaux Kv différents acides aminés chargés au niveau du segment S4. Bien que ce segment S4 ne leur confère pas de sensibilité au voltage (Kohler, M. *et al.*, 1996), il est probable que ces acides aminés chargés soient impliqués dans des liaisons électrostatiques permettant le maintien de la structure 3D correcte de la protéine. En outre, il a été montré que certains de ces acides aminés chargés étaient importants pour la synthèse et le fonctionnement correct des canaux à la membrane (Gao, Y. *et al.*, 2008). Une mutation de l'acide aspartique situé sur le segment S3 ou des arginines du segment S4 de SK2, SK3 ou de IKCa peut entraîner une protéolyse rapide des protéines, une conformation incorrecte et ne permet plus l'adressage correct à la membrane de ces canaux.

### c) Propriétés électrophysiologiques

#### (i) Conductance

Les SKCa possèdent des caractéristiques très distinctes par rapport aux autres canaux potassiques. Lors d'enregistrements en conditions symétriques de  $\text{K}^+$  ( $[\text{K}^+]_{\text{int}} = [\text{K}^+]_{\text{ext}}$ ), ces canaux présentent une conductance de l'ordre de 4 à 14 pS, qualifiée de faible comparée à celle des canaux IKCa et BKCa (Kohler, M. *et al.*, 1996; Hirschberg, B. *et al.*, 1998). Malgré la présence d'acides aminés chargés au niveau du segment S4, leur activation n'est pas dépendante du voltage contrairement au Kv (Hirschberg, B. *et al.*, 1999). Ces canaux ne nécessitent ni ATP, ni nucléotides, ni second messenger intracellulaire (autre que le  $\text{Ca}^{2+}$ ) pour être activés (Xia, X. M. *et al.*, 1998).

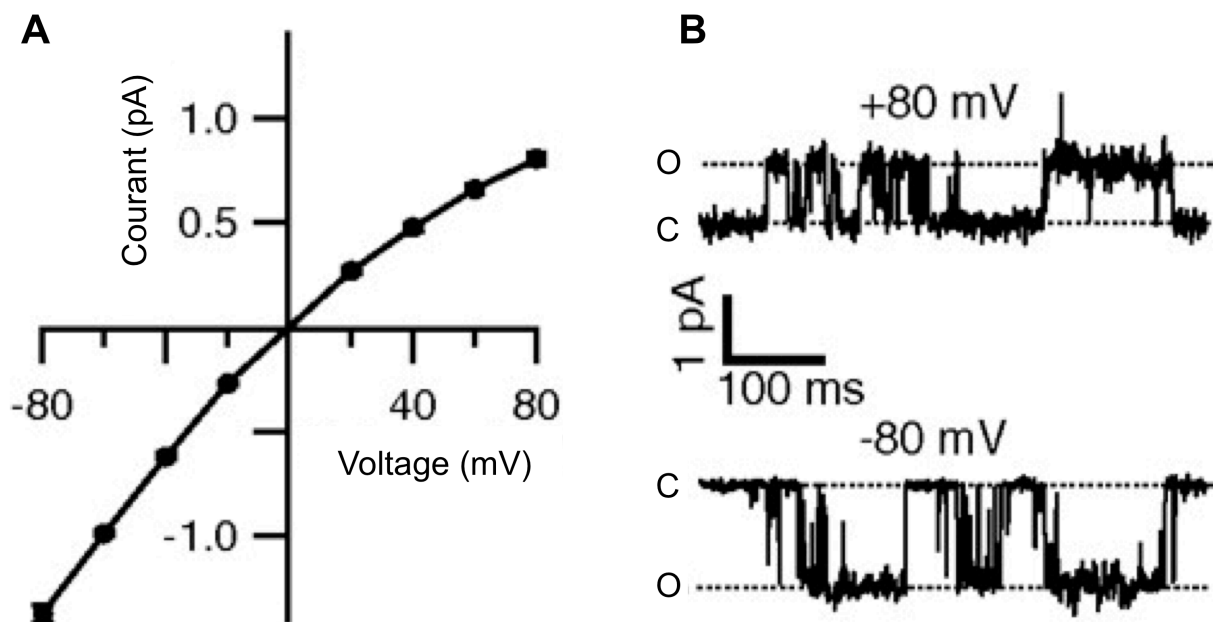
#### (ii) Probabilité d'ouverture ( $P_o$ )

Les travaux de Hirschberg en 1998 ont caractérisé les propriétés biophysiques du canal SK2 en fonction du voltage et de la concentration calcique intracellulaire (Hirschberg, B. *et al.*, 1998). La séquence d'activation du canal peut être schématisée par une chaîne Markovienne à 2 états d'ouverture et 4 états de fermeture. Au cours des expérimentations, ils ont également découvert que le canal présentait deux comportements distincts : des périodes avec une  $P_o$  importante et des périodes avec une  $P_o$  faible. Le changement de comportement est aléatoire au cours du temps mais pour de fortes concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, les périodes avec

une forte  $P_o$  sont majoritaires. Ces résultats ont été reproduits sur des neurones (Hirschberg, B. *et al.*, 1999). Cependant, il semblerait que les courants ioniques de type SKCa présents dans les neurones de l'hippocampe soient portés par SK1 et non par SK2. Ces résultats suggèrent un mécanisme similaire entre SK1 et SK2.

### (iii) La rectification entrante des courants SKCa

Les courants SKCa présentent une rectification dans le sens entrant pour les potentiels les plus positifs (Kohler, M. *et al.*, 1996; Hirschberg, B. *et al.*, 1998; Xia, X. M. *et al.*, 1998) (Figure 12). Le mécanisme passerait par le blocage du pore par les cations divalents de façon similaire à ce qui a été montré pour les Kir (Lu, Z. *et al.*, 1994; Soh, H. *et al.*, 2001). L'étude de Soh montre l'effet des ions divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) sur l'activité du canal SK2 (Soh, H. *et al.*, 2001). Le  $\text{Sr}^{2+}$  et le  $\text{Ba}^{2+}$  activent le canal mais de manière moins importante que le  $\text{Ca}^{2+}$ . Pour les potentiels les plus positifs, il est intéressant d'observer que l'augmentation de la concentration intracellulaire de ces ions diminue l'amplitude du courant mesuré. Le  $\text{Mg}^{2+}$  provoque une inhibition dépendante du voltage. D'autre part, l'augmentation du  $\text{K}^+$  extracellulaire diminue l'effet inhibiteur du  $\text{Mg}^{2+}$ . Le mécanisme a été précisé l'année suivante par la même équipe qui a mis en évidence un site de liaison des cations divalents au niveau du pore (Soh, H. *et al.*, 2002).



**Figure 12. Exemple de courant SKCa et rectification entrante.**

A. Relation courant-voltage représentative d'un courant SKCa obtenu par enregistrement en configuration « Inside-out ». B. Trace représentative du courant d'un canal unitaire à +80 mV et -80 mV. L'amplitude du courant à +80 mV est inférieure à celle à -80 mV, ce qui correspond à la rectification entrante. Modifié d'après Li & Aldrich, 2011, PNAS.

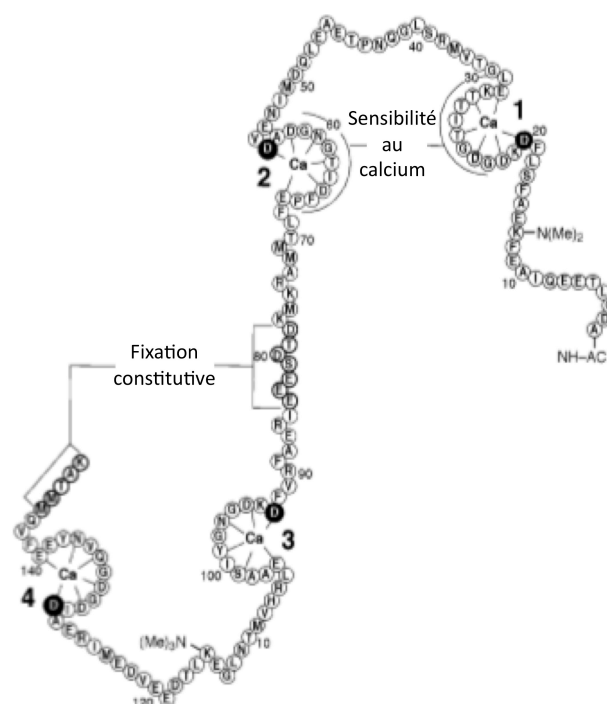
Une étude récente a complété l'explication du mécanisme de la rectification entrante des canaux SKCa. L'implication des ions divalents dans ce phénomène ne serait pas le paramètre majeur. Dans l'étude de Li et Aldrich, il est montré que certains acides aminés chargés positivement et situés à proximité du pore au niveau intracellulaire peuvent altérer la conductance du  $K^+$  au travers du canal (Li, W. *et al.*, 2011). Dans ce cas, la rectification existante pour ces canaux serait une propriété intrinsèque. Ce phénomène serait donc la conséquence d'interférences électrostatiques au niveau de l'entrée du pore qui modifierait aussi bien la disponibilité du  $K^+$  que des ions divalents.

Le principe de la rectification dans le sens entrant mis en avant par ces études est intéressant pour expliquer la forme des courants SKCa (Figure 12). Lors de l'étude d'une isoforme hépatique du canal SK3 de rat, il a été montré une sensibilité au voltage pour ce canal (Barfod, E. T. *et al.*, 2001). Cette isoforme hépatique est particulière car elle diffère de quelques acides aminés au niveau de l'extrémité N-terminale de celle détectée dans le cerveau de rat. Dans le cadre de cette étude, les conditions expérimentales sont les mêmes que celles utilisées pour la démonstration de l'implication des ions divalents dans la réduction du courant pour les potentiels positifs (Soh, H. *et al.*, 2001). Il semble donc que le mécanisme présenté par Barfod corresponde à une rectification du courant et non à une sensibilité au voltage du canal. Cette sensibilité au voltage du canal SK3 n'a d'ailleurs jamais été remise en avant à ma connaissance.

### 3. Canaux SKCa et sensibilité au calcium

Il est établi que l'activation et la  $P_o$  des canaux SKCa sont dépendantes de l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire. Leur sensibilité au  $Ca^{2+}$  est beaucoup plus grande que celle nécessaire à l'activation des canaux BKCa et elle leur est conférée par la présence de la CaM. La concentration de  $Ca^{2+}$  nécessaire à leur demi-activation est de l'ordre de 300 nM et il est observé un phénomène de saturation pour des concentrations supérieures à 10  $\mu$ M (Xia, X. M. *et al.*, 1998). Le coefficient de Hill généralement déterminé dans les différentes études est d'environ 4 (Kohler, M. *et al.*, 1996; Hirschberg, B. *et al.*, 1998; Xia, X. M. *et al.*, 1998). Leur activation se fait au travers d'une modification de conformation de la CaM après fixation du  $Ca^{2+}$  qui se transmet au segment S6 de la sous-unité  $\alpha$ . A l'opposé, la désactivation correspond au décrochage du  $Ca^{2+}$  (Xia, X. M. *et al.*, 1998; Maylie, J. *et al.*, 2004).

La CaM est un médiateur intracellulaire ubiquitaire qui, en fixant des ions calciques, change de conformation et module l'activité de protéines auxquelles elle s'associe (Means, A. R. *et al.*, 1980). Elle possède 4 sites de fixation au  $\text{Ca}^{2+}$  et fonctionne selon un mode coopératif (Figure 13). Ces sites appartiennent à la classe « EF Hand » (motif protéique structural de type hélice-boucle-hélice dont la boucle fixe le  $\text{Ca}^{2+}$ ) qui ont été mis en évidence dans la structure de la parvalbumine (Babu, Y. S. *et al.*, 1985). La CaM est une petite protéine acide conservée au travers des règnes animal et végétal et qui compte 148 acides aminés. Elle est constituée de 2 extrémités globulaires contenant 2 sites « EF Hand » reliées par un pont (« linker »).



**Figure 13. Site de fixation au calcium de la calmoduline.**

La calmoduline présente 4 sites de fixation au  $\text{Ca}^{2+}$  de type « EF Hand ». Les sites 1 et 2 sont impliqués dans la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  du canal alors que les sites 3 et 4 sont engagés dans la fixation constitutive au canal. Modifié d'après Keen *et al.*, Journal of Neuroscience, 1999.

#### a) Mise en évidence et site de fixation de la CaM au SKCa

En 1998, Xia et ses collaborateurs ont montré que l'affinité des SKCa pour le  $\text{Ca}^{2+}$  était proche de celle des protéines contenant des domaines « EF Hand » (Xia, X. M. *et al.*, 1998). Ce sont des domaines présentant une structure « hélice-boucle-hélice » capable de fixer le  $\text{Ca}^{2+}$  avec une très haute affinité. Cependant, la séquence en acides aminés ne comportait aucun domaine homologue connus pour fixer le  $\text{Ca}^{2+}$  : « EF Hand », domaine C2 (similaire à la « calcium bowl » du BKCa). Ils ont ensuite évalué la possibilité que le  $\text{Ca}^{2+}$  se fixe

directement sur le canal par l'intermédiaire d'un acide aminé chargé négativement. Or par mutagenèse dirigée ciblant les acides aminés potentiels au niveau intracellulaire, ils n'ont jamais modifié l'activation du canal. Seule une mutation sur la partie C-terminale provoquait l'apparition d'un canal non fonctionnel. C'est ainsi qu'ils ont mis en évidence la fixation de la CaM au canal SK2 à son extrémité C-terminale. L'interaction entre la CaM et les SKCa est très forte, l'utilisation de conditions strictes (fortes variations de pH, variations de la force ionique) ne permet pas de les dissocier. Il apparaît que la CaM se fixe au canal SK2 selon 2 processus : une partie indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau des acides aminés 390-487 et une partie dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau des acides aminés 423-487.

Par la suite, le site de liaison de la CaM aux canaux SKCa sera nommé « Calmodulin Binding Domain » ou CaMBD. L'étude de Xia présente pour la première fois le schéma d'activation du canal par le  $\text{Ca}^{2+}$  : en se fixant à la CaM, le  $\text{Ca}^{2+}$  entraîne un changement de conformation qui va se répercuter au canal et entraîner son ouverture (Xia, X. M. *et al.*, 1998). L'association entre SK2 et la CaM a alors été fortement étudiée. Il a ainsi été démontré que les domaines de fixation au  $\text{Ca}^{2+}$  ou « EF Hand » n'étaient pas nécessaires à la fixation de la CaM à SK2 (Keen, J. E. *et al.*, 1999). D'autre part, il faut que chaque sous-unité  $\alpha$  du canal soit liée à une CaM pour obtenir un canal fonctionnel.

#### b) Interactions fonctionnelles de la CaM et des SKCa

Il a été démontré que la CaM régule plusieurs fonctions des canaux SKCa. Les domaines « EF Hand » de l'extrémité N-terminale de la CaM (sites 1 et 2) sont essentiels à l'activation dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  du canal (Keen, J. E. *et al.*, 1999) (Figure 13). L'utilisation de mutants de la CaM au niveau des sites « EF Hand » a permis de montrer leurs fonctions. Les mutants des sites 1 et 2 affectent la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  du canal alors que les mutants des sites 3 et 4 n'affectent pas cette propriété. Le canal SKCa est fonctionnel si chaque CaM fixée à une sous-unité SKCa possède au moins un ion  $\text{Ca}^{2+}$  sur le site 1 ou 2. Ces résultats ont été confirmés ultérieurement (Li, W. *et al.*, 2009). Les lanthanides (Terbium, Lanthane, Europium) se fixent avec une plus grande affinité que le  $\text{Ca}^{2+}$  sur les sites 1 et 2 de la CaM. L'étude de Li et Aldrich présente l'activation des SKCa par de très faibles concentrations de terbium (de l'ordre du nanomolaire) qui seraient cohérentes avec la fixation du lanthanide sur la CaM au niveau de l'extrémité N-terminale.

Les sites 3 et 4 de l'extrémité C-terminale (Figure 13) de la CaM sont impliqués dans la fixation constitutive de la CaM au SKCa (Maylie, J. *et al.*, 2004). Quand la liaison entre la CaM et SK2 est réalisée, les sites « EF Hand » 3 et 4 ne peuvent plus fixer de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Une étude récente a approfondi l'explication de ce mécanisme (Li, W. *et al.*, 2009). Les sites 1 et 2 situés à l'extrémité N-terminale participent également à la stabilité du complexe formé par la CaM et le CaMBD. Dans la discussion de cette étude, les auteurs évoquent un problème récurrent dans la compréhension des interactions de la CaM aux canaux SKCa. Les cellules utilisées pour répondre à ces questions expriment de manière endogène la CaM. La conséquence de cette expression est une diminution ou une compensation des effets des mutants utilisés.

La CaM peut réguler l'activité des canaux SKCa selon d'autres processus que nous évoquerons dans la partie « Régulation des Canaux SKCa ».

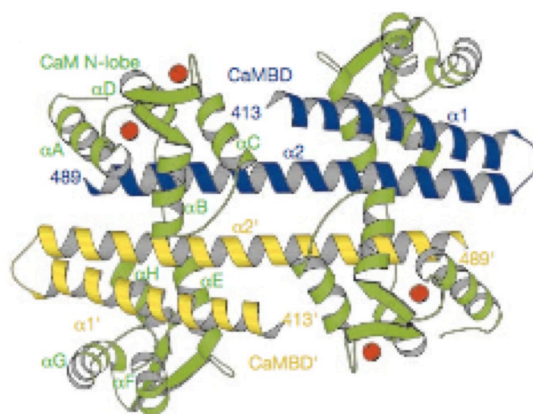
#### c) Le Calmodulin Binding Domain (CaMBD)

Le CaMBD existe uniquement sur les canaux SKCa. Il est fortement conservé dans cette famille de canaux et il ne correspond pas aux autres sites déjà décrits pour l'association d'une protéine à la CaM (Rhoads, A. R. *et al.*, 1997).

D'après Wissman, le CaMBD présente une structure en hélice fortement chargée positivement qui est primordiale pour la fixation constitutive de la CaM (Wissmann, R. *et al.*, 2002). Cette région se situe au niveau des acides aminés 423 à 437 du SK2.

Des approches structurales ont permis la cristallisation des complexes CaM/CaMBD en présence ou en absence de  $\text{Ca}^{2+}$ . Celles-ci ont permis de décrire de manière très détaillée le lien entre le canal SK2 et la CaM. Une première approche a montré le lien entre ces deux protéines en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  (Schumacher, M. A. *et al.*, 2001). Dans cette étude le CaMBD est présenté de la manière suivante : il s'agit de 2 longues hélices alpha (hélice 1 = acides aminés 413-440 ; hélice 2 = acides aminés 446-489) reliées par une petite boucle. Les CaMBD de deux sous unités SK2 vont interagir et la CaM va venir couvrir plus de 80 % de cette structure (Figure 14). De plus, le CaMBD présente une poche hydrophobe indispensable à l'interaction.





**Figure 14. Fixation de la calmoduline sur le domaine de fixation (CaMBD) de SK2 en présence de calcium.**

Les calmodulines sont représentées en vert et 2 CaMBD sont présentés en jaune et bleu. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  (rouge) sont fixés au niveau des EF Hand 1 et 2 de l'extrémité N terminale de la CaM. D'après Schumacher *et al.*, Nature, 2001.

La même équipe a montré quelque années plus tard la fixation de l'apocalmoduline (c'est à dire la calmoduline en absence de  $\text{Ca}^{2+}$ ) sur le CaMBD (Schumacher, M. A. *et al.*, 2004). Dans ce cas la fixation se fait au niveau des acides aminés 430-440 de SK2 comme l'avait montré Wissman (Wissmann, R. *et al.*, 2002). Cet assemblage semble plus souple que l'association en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ . La fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  entraîne donc des modifications intra- et inter- moléculaires.

#### 4. Régulation des canaux SKCa

##### a) Régulation transcriptionnelle

Il a été montré que l'expression de SK2 est modulée par deux facteurs : les glucocorticoïdes et le facteur transcriptionnel NF- $\kappa$ B (Kye, M. J. *et al.*, 2007). Cette régulation a été mise en avant pour la forme courte du canal SK2-S et serait utilisée par les cellules dans le cas de réponses au stress.

Concernant le canal SK3, seul les oestrogènes ont été décrits comme régulateurs de l'expression de ce canal. Malgré les différents éléments de réponse présentés dans l'organisation globale du promoteur du gène codant pour ce canal (Sun, G. *et al.*, 2001), seules les 2 séquences riches en GC pouvant recevoir les facteurs de transcription Sp (Specificity protein) ont été validées d'un point de vue fonctionnel. Ce système de régulation a été présenté dans différentes espèces. En 2002, une étude sur le cobaye a démontré l'augmentation d'expression du canal SK3 sous la dépendance des œstrogènes dans certaines

zones cérébrales durant les périodes ovulatoires (Bosch, M. A. *et al.*, 2002). Par la suite, le groupe de John P. Adelman a mis en évidence la séquence promotrice minimale ainsi que la relation entre le récepteur  $\alpha$  aux oestrogènes et le facteur Sp1 chez le rat (Jacobson, D. *et al.*, 2003). Il a également été relevé lors de la description du profil d'expression des SKCa chez l'Homme que l'expression du canal SK3 dans le corps caverneux était augmentée d'environ 5 fois chez les hommes sous traitement hormonal en prévision d'un changement de sexe (Chen, M. X. *et al.*, 2004). Ce phénomène d'augmentation d'expression du canal a également été montré sur une lignée de cellules de l'endomètre de cochon immortalisée (Palmer, M. L. *et al.*, 2008). Plus récemment, il a été découvert une variation du niveau d'expression de ce canal sous la dépendance des œstrogènes en fonction de la période de la grossesse chez la souris (Pierce, S. L. *et al.*, 2010). Dans cette même étude, la régulation chez l'Homme a également été abordée. Il semble que le mécanisme soit identique à celui présenté chez la souris. Il est observé une diminution du transcrit dans la phase tardive de la grossesse.

A ce jour, rien n'a été décrit sur la modulation de l'expression de SK1.

#### b) Régulation par le calcium

Un facteur de régulation important des SKCa est le  $\text{Ca}^{2+}$ . Il s'agit de l'élément minimal et essentiel requis à l'activation de ces canaux. Sa disponibilité est donc un facteur primordial. Lors de sa fixation à la CaM, l'activation du canal est très rapide ( $\approx 1-5$  msec) (Xia, X. M. *et al.*, 1998; Keen, J. E. *et al.*, 1999). La cinétique d'activation est équivalente à celle d'un récepteur canal (Maconochie, D. J. *et al.*, 1994).

##### (i) L'origine du calcium

Les canaux SKCa en régulant le potentiel de membrane vont moduler l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  qui en retour réglera l'activité des SKCa. Nous pourrions schématiser ce phénomène sous la forme d'un cycle du  $\text{Ca}^{2+}$ . Si il s'agit d'une entrée calcique non dépendante du voltage, l'activation des SKCa va augmenter l'influx calcique en favorisant le gradient électrochimique. Si à l'inverse, ce sont des canaux calciques dépendants du voltage qui réalisent l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ , les canaux SKCa provoqueront leur fermeture en hyperpolarisant la membrane. Ce dernier mécanisme module l'excitabilité des cellules nerveuses. Les différentes voies d'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  validées au niveau du système nerveux central sont répertoriées dans la revue intitulée « Control of K(Ca) channels by calcium Nano/Microdomains » (Fakler, B. *et al.*, 2008). Le

$\text{Ca}^{2+}$  passant au travers de la membrane plasmique au niveau du SNC peut provenir soit de canaux calciques dépendants du voltage (Marrion, N. V. *et al.*, 1998), soit de récepteurs à neurotransmetteurs (acétylcholine ou glutamate) (Oliver, D. *et al.*, 2000; Ngo-Anh, T. J. *et al.*, 2005).

Le  $\text{Ca}^{2+}$  peut aussi venir des stocks intracellulaires (réticulum endoplasmique, mitochondrie) ainsi que de l'extérieur de la cellule par des canaux insensibles au voltage comme les TRP (« Transient Receptor Potential »).

Le dernier point important concernant l'origine du  $\text{Ca}^{2+}$  est la distance entre le canal SKCa et la voie d'apport calcique. Par exemple, un récepteur canal présente une conductance supérieure à celle d'un canal, ce qui entraîne un apport supérieur en  $\text{Ca}^{2+}$  qui peut diffuser sur une zone plus large. La distance peut donc être supérieure entre un récepteur et un canal SKCa que celle entre un canal calcique et un canal SKCa, les deux formant un complexe fonctionnel.

#### (ii) La sensibilité au calcium

Nous avons vu auparavant que en plus de la CaM, la CK2 et la PP2A peuvent former un complexe multiprotéique avec les sous-unités SKCa. La CaM est un substrat de la PP2A et de la CK2 qui vont pouvoir modifier son état de phosphorylation. Ceci a pour conséquence une variation de sa sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  qui va moduler l'activité du canal (Bildl, W. *et al.*, 2004; Allen, D. *et al.*, 2007). La CK2 en phosphorylant la CaM diminue sa sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$ . La PP2A entraîne le phénomène inverse. Ce mécanisme est utilisé par certains neurones (Maingret, F. *et al.*, 2008). L'application de noradrénaline sur des neurones entraîne l'activation de la CK2 spécifiquement fixée au canal SK2, ce qui entraîne une diminution de la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  du canal. Ce mécanisme sert à moduler la durée de la phase AHP dans ces cellules.

La distance de la source du  $\text{Ca}^{2+}$  et la durée de l'influx calcique peuvent être liées à la modulation du canal par la CK2 et la PP2A. Dans un système cellulaire favorisant l'activité de la CK2, l'influx calcique doit être plus important (proximité de la source potentielle) ou plus long pour obtenir un effet du canal SK2 que dans un système favorisant l'activité de la PP2A.

### c) Disponibilité des canaux SKCa à la membrane

La présence, le nombre et la localisation des canaux au niveau membranaire sont 3 points importants pour leurs fonctions. La modulation du trafic intracellulaire est un autre moyen de régulation de l'activité des canaux ioniques.

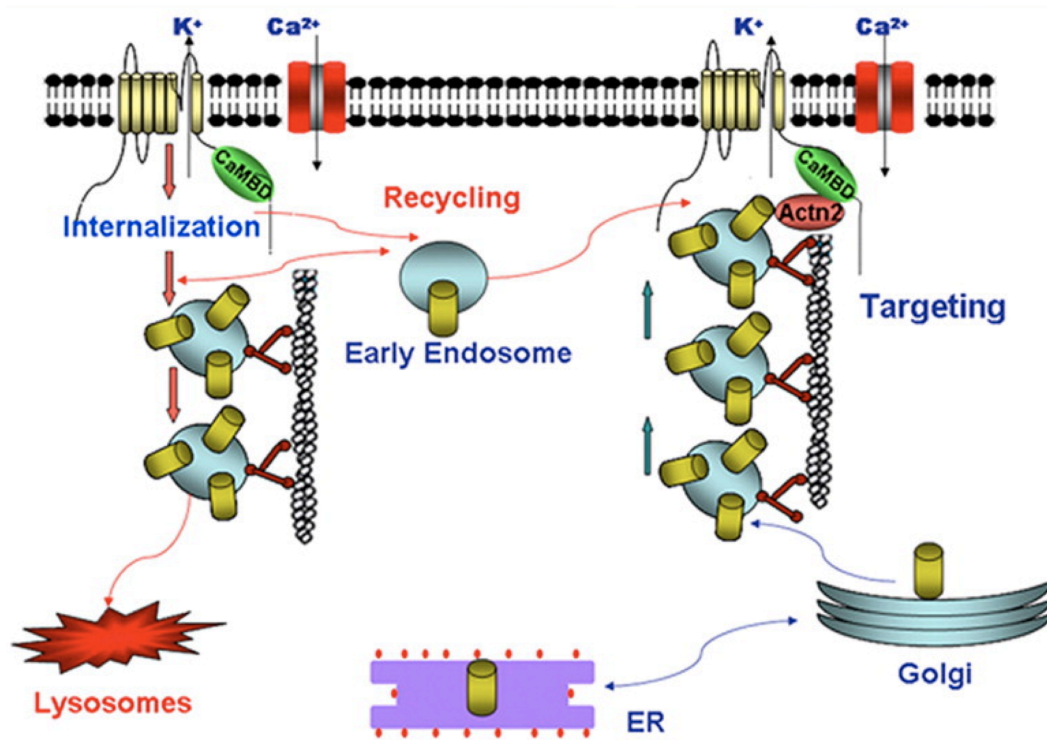
Nous avons vu précédemment que la CaM se fixait de manière constitutive aux canaux SKCa (Maylie, J. *et al.*, 2004). Il a été montré que cette association était essentielle à l'adressage des canaux à la membrane (Lee, W. S. *et al.*, 2003). L'élément régulateur se trouve être dans ce cas la quantité disponible de CaM. En effet, ce médiateur ubiquitaire de la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  possède de nombreuses possibilités d'interactions et son niveau d'expression peut, dans certains cas, ne pas être suffisant pour répondre à l'ensemble des besoins cellulaires (Persechini, A. *et al.*, 2002).

Roncarati a démontré que le canal SK3 pouvait répondre à d'autres mécanismes pour son adressage à la membrane (Roncarati, R. *et al.*, 2005). Différentes parties de la sous-unité SK3 sont nécessaires pour réaliser les différentes étapes du trafic intracellulaire (passage par le réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi et adressage à la membrane) : CaMBD, domaine « Coiled coil » de l'extrémité C-Terminale, séquence située à l'extrémité N-Terminale. Ces données nous indiquent que des mutations au niveau de ces séquences pourraient affecter la distribution et la fonction du canal SK3.

Une étude très récente a montré un mécanisme permettant le maintien de SK3 à la membrane dans une lignée de cellules endothéliales HMEC-1 (human microvascular endothelial cell line) (Gao, Y. *et al.*, 2010). Le canal SK3 est inclus dans un cycle de recyclage très rapide et son association avec différentes protéines lui permet d'être maintenu au niveau de la membrane durant plusieurs heures (12 ou 8 heures respectivement dans les cellules HEK et HMEC-1). A l'opposé, le canal IKCa n'est pas reconnu par ces mêmes protéines et se retrouve très rapidement dans les voies de dégradation (après 5 heures, la majorité des canaux est dégradée). La différence de régulation de ces deux canaux suggère qu'ils interviennent dans des mécanismes différents au niveau de l'endothélium.

L' $\alpha$ -actinine 2 a été montrée pour participer à la localisation membranaire du canal SK2 (Lu, L. *et al.*, 2009). Il est intéressant de noter que l' $\alpha$ -actinine 2 se fixe au canal SK2 par l'intermédiaire du CaMBD. Ceci entraîne un phénomène de compétition entre la CaM et l' $\alpha$ -actinine 2. Cette étude décrit également un système de recyclage et de transport rétrograde du

canal SK2 dépendant de l' $\alpha$ -actinine 2. Ce mécanisme de disponibilité du canal SK2 au niveau membranaire implique la voie des endosomes précoces. Le canal SK2 en utilisant cette voie dans les cardiomyocytes a plusieurs destinées possibles : une dégradation par les lysosomes ou un recyclage vers la membrane (Figure 15).



**Figure 15. Modèle de mécanisme de transport du canal SK2.**

D'après Lu *et al.*, PNAS, 2009.

#### d) Régulation des SKCa par le pH

Il a été montré que l'état de protonation de résidus histidine situés à l'extérieur du pore pouvait inhiber différents canaux potassiques (Cohen, A. *et al.*, 2008; Ureche, O. N. *et al.*, 2008). Les canaux SK2 et SK3 possèdent respectivement une et deux histidines. L'état de protonation de ces acides aminés situés à l'extérieur du pore est sensible aux variations de pH extracellulaire et module la conductance unitaire des canaux SKCa (Goodchild, S. J. *et al.*, 2009). La protonation peut également entraîner un changement de conformation au niveau du site d'interaction des ions divalents situé à l'entrée du pore (Soh, H. *et al.*, 2002).

#### e) Régulation des SKCa par un couplage fonctionnel à un récepteur

Les canaux SKCa sont régulés par l'activation de plusieurs voies de signalisation. Dans différents types de neurones GABAnergiques, il a été montré que l'activation de récepteur adrénergiques ou sensibles à la somatostatine pouvait réguler ces canaux (Wagner, E. J. *et al.*, 2001; Galarraga, E. *et al.*, 2007). Ces agonistes entraînent la diminution de l'amplitude du courant SKCa impliqué dans l'AHP. Cependant dans ces 2 études, les liens entre l'activation des récepteurs et l'inhibition des courants SKCa n'ont pas été démontrés. En effet, aucune description d'une inhibition directe du canal ou de l'inhibition d'une voie d'entrée calcique n'a été publiée à ce jour. Une voie impliquant les récepteurs sigma a également été mise en évidence (Martina, M. *et al.*, 2007). Dans ce travail, l'application de pentazocine inhibe le canal SKCa par son effet sur le récepteur Sigma1. Cet effet de la pentazocine a pour conséquence une potentialisation de l'influx calcique par le récepteur NMDA lors de son activation par le glutamate. La voie de signalisation impliquée dans ce mécanisme n'est pas établie.

#### f) Régulation de l'expression de SK2 par l'hypoxie

Dans des conditions pathologiques, il a été mis en évidence une modulation de l'expression de SK2 par l'hypoxie (Tajima, N. *et al.*, 2006). Lors du développement de tumeurs cancéreuses, la formation de nouveaux vaisseaux n'est pas forcément suffisante pour maintenir un apport en oxygène correct à l'ensemble des cellules. Cependant, d'autres paramètres peuvent évoluer comme l'expression de certains gènes. Dans l'étude de Tajima, l'hypoxie entraîne une augmentation transitoire de l'expression de SK2 (Tajima, N. *et al.*, 2006). Cette augmentation du canal aurait pour conséquence une augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses.

### 5. Pharmacologie des canaux SKCa

Les SKCa sont exprimés dans de nombreux tissus et contrôlent la régulation de multiples fonctions. Ceci a conduit à une étude intensive de la pharmacologie de ces canaux. Des revues récentes rapportent de manière détaillée les différents composants pharmacologiques modulant l'activité des SKCa (Liegeois, J. F. *et al.*, 2003; Wulff, H. *et al.*, 2007; Wulff, H. *et al.*, 2008). La majorité des composés inhibiteurs et activateurs des canaux SKCa et IKCa sont regroupés dans les tableaux 2 et 3.

### a) Inhibiteurs des canaux SKCa

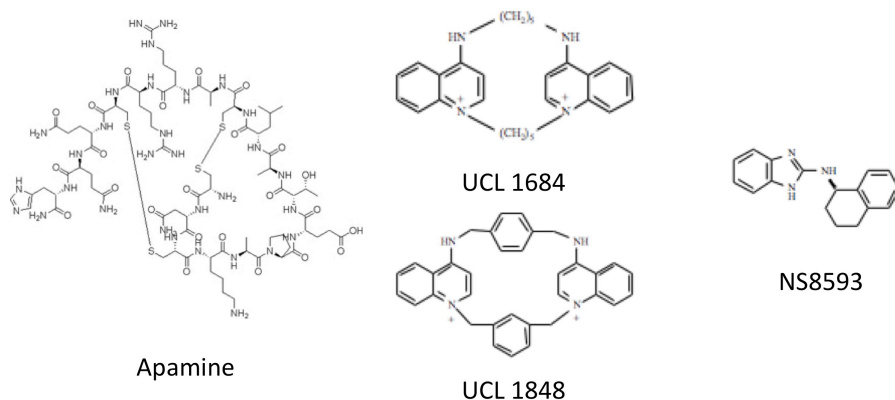
Concernant les inhibiteurs des canaux SKCa, il a été décrit deux classes majeures : les toxines peptidiques et les petites molécules synthétiques (Tableau 2).

Inhibiteur (IC <sub>50</sub> )	KCa2.1	KCa2.2	KCa2.3	Inhibiteur (IC <sub>50</sub> )	IKCa
Tamapine	42 nM	24 pM	1.7 nM	Maurotoxine	1 nM
Apamine	8 nM	30-200 pM	10 nM	Cyclohexadiene 4	1.5 nM
UCL1848	1 nM	110 pM	2 nM	Charybdotoxine	5 nM
Leiurotoxine I	325 nM	200 pM	1 nM	4-phenyl-4H-pyran 11	8 nM
UCL1684	800 pM	200 pM	10 nM	ICA-17043	11 nM
PO5		22 nM	25 nM	Bicyclic hexadiene lactone 16	13 nM
Lei-DAB7	6 µM	5.5 nM	2.5 µM	TRAM-34	20 nM
Tsk		80 nM	197 nM	ShK	30 nM
Déqualinium	400 nM	200 nM		ChTX-Glu	33 nM
NS8593	420 nM	600 nM	730 nM	MgTX	50 nM
UCL 1407		4 µM		TRAM-39	60 nM
Atracurium		4.5 µM		Clotrimazole	70 nM
Tubocurarine	23 µM	5 µM		BgK	172 nM
Pancuronium		6.8 µM		OSK1	225 nM
N-Méthyl-laundanosine		8 µM		TRAM-3	520 nM
Trifluperazine	9 µM	8 µM	20 µM	diS-C2	700 nM
Bicuculline methiodide	15 µM	25 µM	6 µM	UCL 1407	850 nM
Gallamine		14 µM		Nitrendipine	900 nM
Chlorpromazine		12 µM		Nimodipine	1 µM
Carbamazepine		15 µM		UCL 1608	1.5 µM
Cyproheptadiene		15 µM		ShK-Dap	2.6 µM
Imipramine		21 µM		Nifedipine	4 µM
Tacrine		53 µM		UCL 1274	8 µM
Amitriptyline		54 µM	39 µM	Econazole	12 µM
4-AP			512 µM	Cetiedil	25 µM
Decamethonium		620 µM		Ketoconazole	30 µM
Hexamethonium		760 µM		Verapamil	28 µM
TEA	14 mM	3 mM	9 mM	NPPB	39 µM
				NS1619	≈ 40 µM
				Berberine	50 µM
				Quinine	100 µM
				4-AP	> 1 mM
				TEA	24 mM

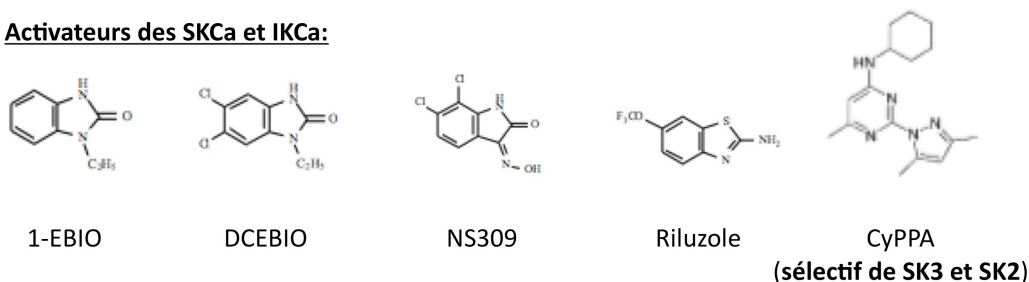
**Tableau 2. Valeurs des IC<sub>50</sub> pour les inhibiteurs des SKCa et de IKCa.**  
D'après Wulff et al., 2007

La toxine qui a permis la mise en évidence des canaux SKCa et qui est toujours un outil incontournable est l'apamine (Figure 16). Il s'agit d'un peptide de 18 acides aminés bien caractérisé issu du venin d'abeille (Habermann, E. 1984; Lamy, C. *et al.*, 2010). D'autres toxines extraites du venin de différents scorpions ont également été montrées pour inhiber les canaux SKCa. Ces toxines agissent au niveau du pore du canal et on parle d'inhibiteurs de types bouchons.

#### Inhibiteurs des SKCa :



#### Activateurs des SKCa et IKCa:



**Figure 16. Structures des composés inhibiteurs et activateurs des canaux KCa.**

Les petites molécules synthétiques correspondent à deux familles de composés. Le premier groupe de composés est basé sur un motif structural minimal comprenant deux atomes d'azote chargés inclus dans des cycles aromatiques. Ces études se sont basées sur la découverte de l'inhibition des canaux SKCa par la D-tubocurarine et le dequalinium (Castle, N. A. *et al.*, 1993). Par la suite, des études de la relation entre la structure et l'activité du déqualinium ont permis la mise en évidence d'une famille de composés inhibant les canaux SKCa à des concentrations de l'ordre du picomolaire. Les deux composés majeurs de ce groupe sont l'UCL1684 (Strobaek, D. *et al.*, 2000) et l'UCL1848 (Hosseini, R. *et al.*, 2001) (Figure 16). Ces molécules déplacent la fixation de l'apamine lors de tests de binding ce qui suggère qu'ils bouchent également le pore du canal. Le deuxième type de composé est dérivé du benzimidazole dont le principal représentant est le NS8593 (Strobaek, D. *et al.*, 2006) (Figure



16). Ce composé inhibe les canaux en modifiant leur sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  mais le mécanisme impliqué n'est pas encore connu.

La plupart de ces inhibiteurs affectent les canaux SK1, SK2 et SK3. Il est important de noter que le plus souvent, le canal SK2 est le plus sensible devant SK3 et SK1. Les efforts dans le développement de nouveaux composés devront être orientés vers la synthèse de molécules ayant une sélectivité plus importante pour une isoforme donnée. Un composé commençant à ouvrir cette voie est le Lei-Dab qui bloque le canal SK2 avec une affinité 650 fois plus importante que pour SK3 et SK1 (Shakkottai, V. G. *et al.*, 2001).

#### b) Activateurs des canaux SKCa

Plusieurs petites molécules hétérocycliques activent les canaux SKCa et IKCa (Tableau 3).

Activateurs ( $\text{EC}_{50}$ )	KCa2.1	KCa2.2	KCa2.3	Activateurs ( $\text{EC}_{50}$ )	IKCa
NS309		620 nM	120 nM	NS309	27 nM
Dichloro-EBIO		27 $\mu\text{M}$	12 $\mu\text{M}$	Dichloro-EBIO	750 nM
Riluzole	2 $\mu\text{M}$	8 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$	Riluzole	2 $\mu\text{M}$
EBIO		450 $\mu\text{M}$	87 $\mu\text{M}$	EBIO	24-80 $\mu\text{M}$
Zoxazolamine		87 $\mu\text{M}$	7 $\mu\text{M}$	Zoxazolamine	98 $\mu\text{M}$
Chlorzoxazone		730 $\mu\text{M}$		Chlorzoxazone	100 $\mu\text{M}$
Theophylline, Caffeine		Pas d'effet		8-Methoxypsoralen	250 $\mu\text{M}$
				Theophylline	1 mM
				Caffeine	1 mM

**Tableau 3. Valeurs des  $\text{EC}_{50}$  pour les activateurs des canaux SKCa et IKCa.**

D'après Wulff *et al.*, 2007.

Ces composés agissent sur les canaux SKCa et IKCa en augmentant leur sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$ . Ceci indique que l'activité de ces molécules nécessite une concentration calcique minimale. Les composés activateurs les plus utilisés sont le 1-EBIO, le DC-EBIO, le NS309 et le riluzole (Syme, C. A. *et al.*, 2000; Pedarzani, P. *et al.*, 2001; Cao, Y. J. *et al.*, 2002; Strobaek, D. *et al.*, 2004) (Figure 16).

Il a été décrit plus récemment le cyclohexyl-[2-(3,5-diméthyl-pyrazol-1-yl)-6-méthyl-pyrimidin-4-yl] ou CyPPA qui présente une meilleure sélectivité que les composés cités précédemment (Hougaard, C. *et al.*, 2007). Ce composé va activer préférentiellement les canaux SK3 et SK2 dans une moindre mesure mais ne présente aucune activité sur les canaux SK1 et IKCa. L'application de CyPPA va décaler la courbe de sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  vers la gauche, diminuant l' $\text{EC}_{50}$  d'environ 400 nM à 59 nM.

## 6. Le canal IKCa, historique et généralités

Il a été montré en 1958 par Gardos que la concentration calcique intracellulaire régula l'efflux de potassium dans les globules rouges (Gardos, G. 1958). Ainsi, une augmentation de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  provoque l'ouverture d'un canal ionique appelé « canal de Gardos » entraînant une fuite de  $\text{K}^+$  et la déshydratation de la cellule. Ce mécanisme est responsable de la forme des globules rouges et il est exacerbé dans l'anémie falciforme. Le canal de Gardos a donc été décrit comme KCa. C'est en 1991 que les propriétés électrophysiologiques (rectification, conductance et sélectivité) de ce canal ont été décrites précisément (Christophersen, P. 1991). Elles seront présentées dans le paragraphe « propriétés électrophysiologiques », page 76.

Le support moléculaire de ce courant ionique a été présenté quelques années plus tard (Ishii, T. M. *et al.*, 1997; Joiner, W. J. *et al.*, 1997). Deux équipes ont employé la même stratégie que pour la mise en évidence des canaux SKCa décrite précédemment. En utilisant des sondes nucléiques codant pour la séquence consensus du pore des Kv (Joiner, W. J. *et al.*, 1997) ou pour un fragment du canal SK2 (Ishii, T. M. *et al.*, 1997), les expérimentateurs ont passé au crible les banques de données. Ils ont ainsi mis en évidence une séquence nucléotidique codant pour un canal possédant de nombreuses similarités structurales avec les canaux SKCa (40 % à 50 %). La protéine issue de ce gène a été dénommée de plusieurs manières: IKCa, SK4, IK1, KCa3.1 (Tableau 1). L'utilisation du nom IK1 peut porter à confusion car il est également utilisé pour un autre canal potassique exprimé dans le cœur. Par la suite, j'utiliserai uniquement le terme IKCa pour décrire le canal de conductance intermédiaire activé par le calcium. La protéine décrite par Ishii *et al.* détectée au niveau du pancréas possède 428 acides aminés (Ishii, T. M. *et al.*, 1997). La structure de ce canal est similaire à celle des canaux SKCa avec 6 TM et 1 domaine pore.

La séquence codant pour ce canal se trouve sur le chromosome 19 au niveau du locus 19q13.2 (Ghanshani, S. *et al.*, 1998). L'équipe de G. Chandy a présenté en 2000 différents mécanismes de régulation transcriptionnelle de ce canal (Ghanshani, S. *et al.*, 2000). Dans cette étude, ils ont montré que le promoteur du gène KCNN4 comportait des éléments de réponse aux facteurs de transcription AP-1 et Ikaros 2. Ces facteurs interviennent dans l'expression basale de la protéine mais sont également importants lors de l'augmentation d'expression de IKCa induite par l'activation des lymphocytes T.

A la différence des canaux SKCa, l'expression du transcrit codant pour le canal IKCa n'est pas retrouvée dans les cellules excitables (neurones, muscles squelettiques, cœur) (Jensen, B. S. *et al.*, 1998). Le transcrit est retrouvé principalement dans les glandes salivaires, le placenta, les poumons ou la trachée (Jensen, B. S. *et al.*, 1998). Son expression dans les tissus épithéliaux suggère que ce canal pourrait participer aux transports liquidiens et ioniques épithéliaux. D'autre part, ce canal a été décrit comme jouant un rôle important dans l'activation des cellules lymphocytaires (Logsdon, N. J. *et al.*, 1997; Ghanshani, S. *et al.*, 2000). Par la suite, le canal IKCa a été détecté sporadiquement dans certains neurones (Boettger, M. K. *et al.*, 2002; Vogalis, F. *et al.*, 2002; Bahia, P. K. *et al.*, 2005; Neylon, C. B. *et al.*, 2006). Cependant, la fonction de cette protéine dans ces cellules n'a pas été entièrement élucidée excepté dans les neurones du plexus myentérique où ce canal régule l'AHP (Vogalis, F. *et al.*, 2002; Neylon, C. B. *et al.*, 2006).

## 7. Propriétés électrophysiologiques du canal IKCa

Afin de déterminer les caractéristiques fonctionnelles de ce canal, différents groupes ont forcé l'expression de cette protéine dans plusieurs modèles cellulaires ne l'exprimant pas. Il a été démontré que le canal IKCa présente une conductance d'environ 40 pS en condition iso-K<sup>+</sup> (Ishii, T. M. *et al.*, 1997; Joiner, W. J. *et al.*, 1997; Jensen, B. S. *et al.*, 1998). Il a également été décrit une rectification entrante. Par exemple, l'étude de Jensen *et al.* indique que l'amplitude du courant obtenue pour un canal unitaire est de 3 pA à -100 mV et 1 pA à + 100 mV en condition symétrique de K<sup>+</sup> (Jensen, B. S. *et al.*, 1998). Comme les canaux SKCa, l'activation du canal IKCa n'est pas dépendante du voltage.

## 8. Pharmacologie et régulation du canal IKCa

### a) Modulation pharmacologique du canal IKCa

La pharmacologie du canal IKCa a été très étudiée et a fait l'objet de plusieurs revues (Wulff, H. *et al.*, 2007; Kohler, R. *et al.*, 2010) (Tableaux 2 et 3).

Le canal IKCa est inhibé par différentes toxines peptidiques. La plus efficace et spécifique est la maurotoxine qui possède un IC<sub>50</sub> pour ce canal d'environ 1 nM (Castle, N. A. *et al.*, 2003). Le canal IKCa est également inhibé par la charybdotoxine (ChTx), mais cette toxine de

scorpion inhibe également le canal BKCa et le Kv1.3 contrairement à la maurotoxine (Ishii, T. M. *et al.*, 1997; Joiner, W. J. *et al.*, 1997).

D'autre part, le canal IKCa peut également être inhibé par différentes classes de petites molécules. Les deux composés les plus utilisés sont le clotrimazole (un antimycosique, (Alvarez, J. *et al.*, 1992)) et le TRAM-34. Le clotrimazole présente différents effets secondaires comme l'inhibition du cytochrome P450. Afin d'obtenir des composés plus spécifiques, des études de la relation entre la structure et l'activité ont été réalisées à partir du clotrimazole et ont permis de sélectionner le TRAM-34 comme l'inhibiteur le plus efficace de IKCa (Wulff, H. *et al.*, 2000).

Comme déjà dit précédemment, la pharmacologie du canal IKCa a été fortement étudiée. C'est ainsi que certains composés activateurs ont également été mis en évidence. Ces molécules appartiennent à la famille des benzimidazolones et à celle des benzothiazoles. Ces composés sont également capables d'activer les SKCa. Les activateurs majeurs du canal IKCa sont le 1-EBIO et le DC-EBIO (Pedersen, K. A. *et al.*, 1999; Syme, C. A. *et al.*, 2000) (Tableau 3, Figure 16).

#### b) Modulations physiologiques du canal IKCa

Son activation est dépendante de la concentration calcique intracellulaire (Ishii, T. M. *et al.*, 1997; Joiner, W. J. *et al.*, 1997). La sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  de ce canal lui est conférée par la fixation de la CaM à son extrémité C-terminale de manière similaire aux SKCa (Fanger, C. M. *et al.*, 1999). L'extrémité C-terminale située juste après le pore est extrêmement conservée avec les canaux SKCa. Les 98 acides aminés composant cette séquence sont essentiels à la fixation de la CaM. De la même manière que cela a été démontré pour les canaux SKCa, la fixation de la CaM au canal IKCa peut se faire en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  et la liaison entre le canal et la CaM est très stable.

L'origine du  $\text{Ca}^{2+}$  nécessaire à l'activation du canal dépend du tissu où il est exprimé. Il a ainsi été montré que dans le colon, le canal IKCa est activé par l'influx calcique dépendant de l'activation d'un récepteur couplé à une protéine G (Bahia, P. K. *et al.*, 2005). Dans les lymphocytes, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  est réalisée par les CRAC (Calcium Released Activated Calcium Channel) (Chandy, K. G. *et al.*, 2004; Feske, S. *et al.*, 2006).

Il a également été montré que le canal IKCa était modulé par l'activité de protéine kinase A (PKA) (Gerlach, A. C. *et al.*, 2000). L'application d'ATP lors d'expérience de patch clamp en canal unitaire présente une augmentation de la  $P_o$  du canal. En examinant le mécanisme de manière approfondie, ils ont montré que l'activation était dépendante de la PKA. Cette protéine est associée à la membrane car elle n'est pas perdue lors de l'excision du morceau de membrane. La même équipe a présenté par la suite la séquence d'acides aminés nécessaires à l'activation dépendante de la PKA (Gerlach, A. C. *et al.*, 2001). En réalisant des protéines chimères de IKCa et de SK2, ils ont démontré qu'un fragment d'une soixantaine d'acides aminés de l'extrémité C-terminale était nécessaire et suffisante à l'activation du canal par la PKA. De plus, des mutations ponctuelles sur les sites potentiels de phosphorylation n'empêchent pas l'activation par la PKA. Ces éléments suggèrent que l'activation par la PKA ne se réalise pas par une phosphorylation directe du canal sur son extrémité C-terminale.

L'équipe de Skolnik s'est attachée à décrire la modulation du canal IKCa par une voie de signalisation dépendante du phosphatidylinositol-3-phosphate (PI(3)P). Il a été montré, dans un premier temps, la régulation de l'activité de IKCa par le PI(3)P (Srivastava, S. *et al.*, 2005). La myotubularine 6 (MTMR6), une phosphatase qui transforme le PI(3)P en  $PiP_2$ , inhibe l'activité du canal et cela ne passe pas par une altération du trafic à la membrane de la protéine IKCa. Par la suite, ils ont montré que l'activation de IKCa par PI(3)P était réalisée de manière indirecte (Srivastava, S. *et al.*, 2006). L'ajout de PI(3)P dans les solutions intracellulaires d'expériences de patch clamp en configuration « Inside/out » n'a aucun effet. Ils ont également présenté la nécessité d'une séquence de quatorze acides aminés situés à l'extrémité C-terminale pour obtenir la régulation du canal par le PI(3)P. Il a été décrit postérieurement l'implication de la Nucléoside DiPhosphate Kinase Beta (NDPK-B) dans cette voie de signalisation (Srivastava, S. *et al.*, 2006). Cette kinase est co-immunoprécipitée avec le canal dans les cellules HEK293 surexprimant les deux protéines mais également dans des systèmes endogènes (lymphocytes T CD4). La NDPK-B phosphoryle directement le canal sur l'histidine 358 qui est incluse dans la séquence de quatorze acides aminés nécessaires à cette voie de signalisation. Il est intéressant de noter que la phosphorylation des histidines est un phénomène peu courant dans les cellules de mammifères. Ils ont également identifié la phosphatase impliquée dans la régulation de ce mécanisme (Srivastava, S. *et al.*, 2008). La phosphohistidine phosphatase 1 (PHPT-1) a ainsi été montrée pour inhiber l'activité de IKCa en déphosphorylant l'histidine 358. Ils ont par la suite montré que des souris KO pour la PHPT-1 présentent une déficience de l'activation des cellules T en raison d'une diminution de

l'activité du canal IKCa (Di, L. *et al.*, 2010). En général, la régulation de l'activité des SKCa a été évaluée en parallèle de celle du canal IKCa. Quelles que soient les conditions utilisées, le PI(3)P n'affecte pas l'activité des SKCa. Ils ont montré que la séquence située en C-terminale des SKCa ne présentait pas les caractéristiques nécessaires à la phosphorylation par la NDPK-B.

L'activité du canal IKCa est également inhibée par l'acide arachidonique (AA) (Devor, D. C. *et al.*, 1998). Dans la lignée cellulaire de colon, les cellules T84, il a été montré que la sécrétion de  $\text{Cl}^-$  était dépendante d'une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Cette augmentation serait liée à l'expression et à l'activité du canal IKCa. L'étude des voies de signalisation a permis de montrer que ni les protéines kinases C (PKCs), ni les composés de la famille des inositol polyphosphates n'avaient d'effet sur IKCa. Ils ont alors regardé l'effet de l'AA. Ce lipide insaturé est un second messager dont la concentration est augmentée lors d'une élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Dans ce travail (Devor, D. C. *et al.*, 1998), l'AA inhibe IKCa mais cela n'est pas spécifique de cet acide gras. L'acide linoléique, l'acide élaïdique et l'acide myristique sont également capables d'inhiber le canal IKCa. Ces acides gras ne présentent aucune activité sur le canal SK2. Un site d'action de l'AA sur le canal IKCa a été identifié quelques années plus tard (Hamilton, K. L. *et al.*, 2003). Cet argument démontre qu'il ne s'agit pas d'un effet membranaire. Cette seconde étude a permis de localiser le site de liaison de l'AA en réalisant des chimères entre IKCa et SK2 et par des techniques de mutagenèse dirigée. Il s'agit de la thréonine 250 et de la valine 275 qui se situent au niveau du pore du canal. Il est intéressant de noter que ces acides aminés sont aussi impliqués dans l'inhibition de IKCa par le clotrimazole (Wulff, H. *et al.*, 2001).

### C. Rôles physio-pathologiques des KCa

Le rôle principal des canaux KCa est de lier la concentration calcique intracellulaire au potentiel de membrane. La relation entre ces 2 paramètres est essentielle au fonctionnement de nombreux types cellulaires. Cependant, l'activité de ces canaux est soumise à de nombreuses régulations comme nous avons pu le voir précédemment. Le dérèglement de l'une des composantes peut rapidement faire passer le fonctionnement du canal de l'état normal à l'état dérégulé.

## 1. Rôles des SKCa dans les conditions physiologiques

Nous allons nous attacher à observer quelle est l'implication des SKCa dans des conditions physiologiques ou pathologiques. Un très bel outil permettant l'étude des fonctions du canal SK3 a été mis en place par l'équipe de J. Adelman (Bond, C. T. *et al.*, 2000). Ce modèle présente les caractéristiques suivantes. Les souris génétiquement modifiées (souris SK3<sup>T/T</sup>) présentent une expression des transcrits de SK3 trois fois plus importante que les souris « wild type ». Sous un régime supplémenté en doxorubicine, l'expression de la protéine est totalement inhibée. C'est un modèle d'expression conditionnelle de SK3. La distribution du canal dans le cerveau des souris SK3<sup>T/T</sup> n'est pas modifiée par rapport aux souris contrôle.

### a) Système nerveux central

C'est dans le système nerveux central (SNC) que le rôle des canaux SKCa a été le plus étudié. Après le clonage des séquences codantes pour les trois sous-unités  $\alpha$  (Kohler, M. *et al.*, 1996), le rôle des canaux SKCa était souvent limité à la régulation de la fréquence des potentiels d'action (PA) et au contrôle de l'excitabilité des cellules nerveuses (Sah, P. *et al.*, 2002; Pedarzani, P. *et al.*, 2008). Leurs activités ont été étudiées dans différents types cellulaires comme par exemple : les neurones sympathiques (Pennefather, P. *et al.*, 1985), les neurones subthalamiques (Hallworth, N. E. *et al.*, 2003), les cellules mitrales du bulbes olfactif (Maher, B. J. *et al.*, 2005). Ils régulent de nombreuses fonctions comme la mémorisation, l'apprentissage, la plasticité synaptique ou le cycle du sommeil (Gandolfo, G. *et al.*, 1996; Fournier, C. *et al.*, 2001; Stackman, R. W. *et al.*, 2002). Une revue récente relate de manière beaucoup plus détaillée l'ensemble des fonctions au niveau cérébral (Faber, E. S. 2009).

### b) Rôles des canaux SKCa dans les cellules musculaires

Les canaux SKCa participent au couplage excitation-contraction des cellules musculaires. Pour la vessie, les SKCa ont été impliqués dans la contraction des cellules musculaires lisses (Herrera, G. M. *et al.*, 2003; Thorneloe, K. S. *et al.*, 2008). Dans son étude, Herrera a utilisé les souris SK3<sup>T/T</sup>. Lorsque l'expression de SK3 est inhibée (régime doxorubicine), la fréquence des contractions du muscle lisse de la vessie est augmentée. D'autre part, la surexpression du canal SK3 dans les souris SK3<sup>T/T</sup> non traitées, provoque une augmentation de l'épaisseur de la paroi vésicale et de sa capacité à contenir l'urine.

Les canaux SKCa ont également été mis en évidence dans le cœur avec un profil d'expression différent entre les oreillettes et les ventricules (Tuteja, D. *et al.*, 2005). Leur rôle dans le cœur dans des conditions physiologiques a cependant été peu étudié. En 2003, Xu *et al.* ont montré l'implication de l'isoforme SK2 dans la repolarisation du potentiel d'action atrial (Xu, Y. *et al.*, 2003). La mise en évidence du rôle de ce courant repolarisant a été tardive en raison de l'utilisation de fortes concentrations de chélateurs calciques pour les enregistrements électrophysiologiques de ces cellules cardiaques. Ceci avait pour conséquence le masquage des courants SKCa.

#### c) Fonction respiratoire et parturition

Lors de la description des souris SK3<sup>T/T</sup>, ce modèle a permis de dévoiler deux fonctions régulées par le canal SK3 : le profil respiratoire en condition hypoxique et la parturition (Bond, C. T. *et al.*, 2000).

Lors de tests en condition hypoxique, la surexpression du canal par les souris SK3<sup>T/T</sup> entraîne une disparition du phénomène de tachypnée observé chez les souris contrôles. Ceci serait lié à la surexpression du canal dans une zone cérébrale responsable de la régulation de la respiration. D'autre part, dans ce modèle, l'augmentation de l'expression de SK3 au niveau du muscle lisse utérin entraîne une hyperpolarisation importante du muscle. Les contractions utérines ne sont alors plus assez importantes pour expulser le petit de l'utérus entraînant un dysfonctionnement de la parturition. Plus récemment, une étude a montré l'implication des canaux SK1, 2 et 3 dans le myomètre et l'évolution de leur expression au cours de la gestation (Noble, K. *et al.*, 2010). Cette étude confirme les résultats obtenus précédemment. Les SKCa sont importants dans la régulation de la fréquence et de l'amplitude des contractions utérines.

#### d) Rôle des canaux SKCa dans le tube digestif

Différents travaux ont également montré l'expression des SKCa dans le tube digestif (colon, intestin grêle) de différentes espèces : rat, souris, chien, cochon d'inde, Homme (Fujita, A. *et al.*, 2001; Ro, S. *et al.*, 2001; Fujita, A. *et al.*, 2003). Il a été montré que l'application d'apamine augmentait l'activité péristaltique et la fréquence de contractions phasiques du colon (Ro, S. *et al.*, 2001). La seconde partie des travaux a permis de localiser le type cellulaire exprimant les canaux SKCa. La première description a montré l'expression des SKCa dans les cellules de Cajal (Fujita, A. *et al.*, 2001). Il s'agit de cellules présentant une



activité automatique induisant l'activité mécanique des cellules musculaires lisses. Par la suite, la même équipe a remis en question cette conclusion et a proposé que les SKCa soient exprimés dans des cellules de type fibroblastique (Fujita, A. *et al.*, 2003). Dans ces différents travaux, il est établi que les cellules musculaires lisses n'expriment pas les SKCa.

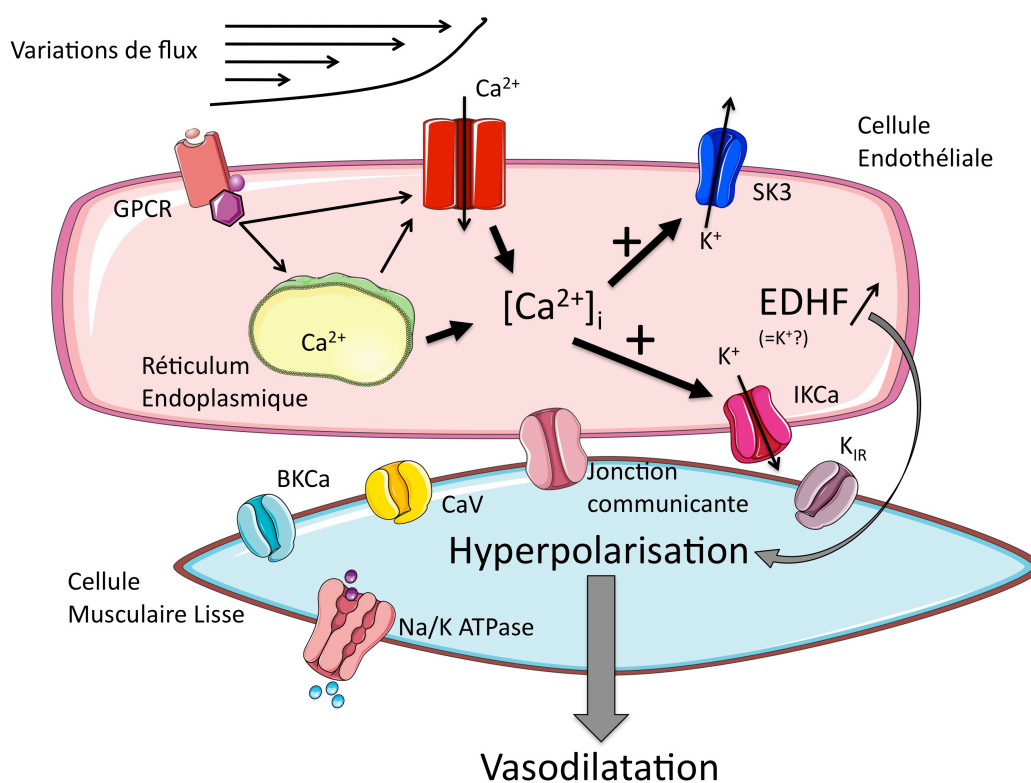
Si nous restons au niveau du système digestif, les canaux SKCa ont également été mis en évidence au niveau du pancréas (Tamarina, N. A. *et al.*, 2003). Il est connu depuis longtemps que la stimulation des cellules  $\beta$  par une concentration de glucose supérieure ou égale à 7 mM entraîne une forte activité électrique de ces cellules ainsi que des variations du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et la libération de l'insuline (Ashcroft, F. M. *et al.*, 1989; Gilon, P. *et al.*, 1993). La régulation de ces phénomènes électriques est très complexe et implique de nombreux canaux (Jacobson, D. A. *et al.*, 2010). Dans les cellules  $\beta$  du pancréas, les SKCa hyperpolarisent la membrane lorsque le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire augmente suite à l'application de glucose. Ce mécanisme permet la régulation du relargage d'insuline induite par le glucose. Cette fonction dans le relargage d'hormone avait déjà été montrée précédemment (Tse, A. *et al.*, 1992). Cependant les différents travaux menés sur la relation entre la libération d'insuline et les canaux SKCa arrivent à des conclusions variables en raison de réponses divergentes à l'apamine (Tamarina, N. A. *et al.*, 2003; Zhang, M. *et al.*, 2005). Dans le cadre de ces recherches, il est intéressant de relever une étude réalisée par Andres et ses collaborateurs (Andres, M. A. *et al.*, 2009). Ils ont découvert le rôle important du canal SK1 dans la sécrétion d'insuline chez le rat. Or la forme rSK1 ne semble pas être capable de former des canaux homomériques fonctionnels dans les systèmes d'expression de cellules de mammifères (Benton, D. C. *et al.*, 2003). L'étude d'Andres suggère l'existence d'une sous-unité annexe nécessaire à la formation de SK1 fonctionnels (homo- ou hétérotétramères) dans son contexte original. Il est également possible que la fonction pore du canal SK1 ne soit pas essentielle et que cette protéine agisse en tant que molécule d'adhésion par exemple.

#### e) Rôle des KCa dans les cellules endothéliales

Le canal SK3 est exprimé dans les cellules endothéliales vasculaires tout comme le canal IKCa. Au travers de la littérature, différentes revues récentes présentent de manière détaillée les implications de ces canaux dans ces cellules (Grgic, I. *et al.*, 2009; Kohler, R. *et al.*, ). Il a ainsi été démontré que les canaux SK3 et IKCa régulaient la vasodilation induite par l'EDHF (Endothelium-derived hyperpolarizing factor) ou par le NO (monoxyde d'azote). Les différentes relations pouvant exister entre ces 2 protéines ont également été élucidées, en

partie, par l'utilisation de souris transgéniques n'exprimant plus soit SK3 soit IKCa soit les deux simultanément (Brahler, S. *et al.*, 2009). C'est l'hyperpolarisation induite par SK3 qui est importante dans la régulation de la pression et du flux sanguin (Taylor, M. S. *et al.*, 2003). Ce canal régule la vasodilatation induite par le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, EDHF (Burnham, M. P. *et al.*, 2002; Eichler, I. *et al.*, 2003).

Le mécanisme régulant cette fonction est le suivant (Figure 17) : une variation du flux entraîne une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Cette accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  active le canal SK3 qui hyperpolarise les cellules endothéliales. Dans ces conditions, le  $\text{K}^+$  est extrudé des cellules endothéliales au travers du canal IKCa, situé à proximité des membranes des cellules musculaires lisses, et provoque l'hyperpolarisation des ces dernières en activant le  $\text{K}_{\text{IR}}$ . La répercussion physiologique de ce mécanisme est une vasodilatation. Ce processus suggère que l'EDHF pourrait être le  $\text{K}^+$ .



**Figure 17. Mécanisme de vasodilatation dépendant des canaux SKCa et IKCa.**

La variation du flux sanguin provoque un influx calcique dans la cellule endothéliale qui entraîne l'hyperpolarisation dépendante des canaux SK3 et IKCa. L'hyperpolarisation des cellules endothéliales provoque le relargage de l'EDHF qui entraîne l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses ce qui provoque la vasodilatation. GPCR : récepteur couplé au protéine G,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  : concentration calcique intracellulaire, EDHF : Facteur Hyperpolarisant Dérivé de l'Endothélium,  $\text{K}_{\text{IR}}$  : canal potassique à rectification entrante, CaV : canal calcique dépendant du voltage.

Un élément pouvant expliquer les différents rôles de SK3 et IKCa est leur localisation au niveau subcellulaire : le canal SK3 est exprimé dans les cavéoles au niveau de la membrane luminale des vaisseaux (Absi, M. *et al.*, 2007) ; à l'opposé les canaux IKCa sont situés au niveau des jonctions entre cellules endothéliales et cellules musculaires lisses.

## 2. Rôles des SKCa dans les pathologies autres que le cancer

Les canaux SKCa régulent de nombreuses fonctions, ce qui suggère qu'une modification de leur modulation peut entraîner des dysfonctionnements responsables de pathologies. Il a été démontré l'implication de ces canaux dans les cancers, cette partie sera développée dans le paragraphe « Rôles des canaux KCa dans le cancer » (page 90).

### a) Pathologies du système nerveux central

Les canaux SKCa ont été décrits pour la première fois dans le SNC (Kohler, M. *et al.*, 1996). Rapidement leur implication dans différentes pathologies cérébrales a été démontrée. Les premiers travaux ont concerné le motif polyglutamine du canal SK3 et la corrélation entre la variabilité de ce motif et la schizophrénie ou les troubles bipolaires (Chandy, K. G. *et al.*, 1998; Bowen, T. *et al.*, 2001). Cependant, ces résultats ont été très discutés et de nombreuses études rapportent des conclusions contradictoires (Antonarakis, S. E. *et al.*, 1999; Bonnet-Brilhault, F. *et al.*, 1999; Joobers, R. *et al.*, 1999).

D'autre part, le rôle décrit initialement pour les canaux SKCa était le contrôle de l'excitabilité des neurones et leur modulation de la phase AHP. Si un dysfonctionnement de ces canaux apparaît, les cellules peuvent se trouver dans un état d'hyperexcitabilité conduisant à différentes pathologies. Il a été montré que des troubles de la régulation de l'AHP dans les neurones de l'hippocampe, zone où le canal SK3 est fortement exprimé, provoque l'apparition de phénomènes épileptiformes (McCormick, D. A. *et al.*, 2001; Fernandez de Sevilla, D. *et al.*, 2006). D'autres études ont montré que les canaux SKCa pouvaient être impliqués dans différentes pathologies comme l'ataxie, la maladie de Parkinson ou bien l'anorexie nerveuse (Salthun-Lassalle, B. *et al.*, 2004; Walter, J. T. *et al.*, 2006; Koronyo-Hamaoui, M. *et al.*, 2007). Il a également été montré que l'augmentation d'expression du canal SK3 avec le vieillissement était corrélée à un déficit progressif de la mémoire (Blank, T. *et al.*, 2003). Les différents outils pharmacologiques ciblant les canaux SKCa permettent d'envisager de nouvelles thérapies pour ces différentes maladies (en les activant dans le cas de l'épilepsie ou

en les inhibant pour augmenter le relargage de dopamine pour la maladie de Parkinson) (Alvina, K. *et al.*, 2010).

#### b) Implication des canaux SKCa dans les pathologies cardiovasculaires

Comme il a été décrit que l'EDHF était impliqué dans différentes pathologies comme l'hypertension, la sténose secondaire, les conséquences vasculaires du diabète ou bien le vieillissement, il n'est pas surprenant d'observer que les SKCa soient impliqués dans ces pathologies (Grgic, I. *et al.*, 2009). Il a été montré que l'endothélium reformé après des interventions chirurgicales (pose de cathéter, pontage coronarien) présentait une expression altérée des canaux KCa (Urakami-Harasawa, L. *et al.*, 1997; Kohler, R. *et al.*, 2001; Feng, J. *et al.*, 2008) : diminution de l'expression de SK3 et de BKCa, augmentation de IKCa. Les conséquences sont une diminution de l'hyperpolarisation, diminution de la vasodilatation et par conséquent une augmentation de la pression.

Il a également été montré que des lésions rénales provoquant une urémie entraînaient une hypertension secondaire (Kohler, R. *et al.*, 2005). Dans le cas de cette hypertension, il a été décrit que le canal SK3 présentait une expression et une fonction diminuées dans les cellules endothéliales. Ceci a pour conséquence une défaillance de la vasodilatation dépendante de l'EDHF.

D'autres travaux ont également montré que différents types d'hypertension (hypertension induite par l'angiotensine 2 ou par l'ADMA (Asymmetric dimethylarginine), liée au diabète...) provoquaient des modifications de l'expression des canaux SKCa et de leurs fonctions (Taylor, M. S. *et al.*, 2003; Ding, H. *et al.*, 2005; Hilgers, R. H. *et al.*, 2007; Li, J. *et al.*, 2007).

Il a également été rapporté, dans un modèle d'insuffisance cardiaque sévère, que les SKCa pouvaient moduler la durée du potentiel d'action ventriculaire (Chua, S. K. *et al.*, 2011). Comme nous l'avons décrit précédemment, les canaux SKCa sont exprimés majoritairement dans les oreillettes. Cependant, l'étude de Chua montre que les canaux SKCa peuvent intervenir au niveau ventriculaire lors d'événements pathologiques (fibrillation auriculaire).

### c) Troubles de l'accouchement

Le canal SK3 a également été impliqué dans différents problèmes liés à l'accouchement. Lors de la caractérisation de la souris à expression conditionnée pour le canal SK3, il a été clairement établi que la surexpression de ce canal entraînait une hyperpolarisation importante pendant le travail ce qui entraînait un trouble de l'accouchement (Bond, C. T. *et al.*, 2000). La souris SK3<sup>T/T</sup>, qui surexprime le canal SK3, n'a plus la capacité d'évacuer sa progéniture à cause de l'affaiblissement des contractions utérines.

Récemment, de nouveaux éléments indiquent que différentes mutations ponctuelles au niveau du gène KCNN3 pouvaient être associées à des naissances prématurées (Day, L. J. *et al.*, 2011). Il s'agit de SNP (Single-Nucleotide Polymorphism) qui se situent principalement au niveau de séquences introniques. Les conséquences physiologiques sur la contractilité du muscle utérin ne sont pas encore connues. Cependant, l'une des régions où se situe un de ces SNP a été précédemment associée à un type de fibrillation auriculaire (Ellinor, P. T. *et al.*, 2010). De même que pour le problème d'accouchement prématuré, la signification mécanistique dans la fibrillation auriculaire de cette variation génétique n'a pas encore été mise en évidence.

## 3. Rôles de IKCa dans les conditions physiologiques

Le canal IKCa participe à la régulation de la prolifération cellulaire, du volume cellulaire ou à la sécrétion de Cl<sup>-</sup> dans différents types cellulaires. Il s'intègre à des voies de signalisation dans lesquelles le Ca<sup>2+</sup> intervient en tant que médiateur.

### a) Régulation de la sécrétion de chlore

Au niveau du tube digestif et des voies aériennes, la sécrétion de Cl<sup>-</sup> est un phénomène important. Cette sécrétion est régulée par le potentiel de membrane des cellules. L'activation du canal IKCa induite par une augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire va provoquer une hyperpolarisation de la membrane cellulaire qui activera la sécrétion du Cl<sup>-</sup>. Ce mécanisme a été montré dans les cellules du jéjunum de souris (Hamilton, K. L. *et al.*, 1999) ou dans les cellules des cryptes du colon de rat (Warth, R. *et al.*, 1999).

Il a également été montré que l'application de 1-EBIO augmente la sécrétion de Cl<sup>-</sup> dans la lignée cellulaire Calu-3 (cellules cancéreuses pulmonaires) (Devor, D. C. *et al.*, 1999). Dans ces cellules (assimilées à des cellules des voies aériennes dans cette étude), le canal IKCa est

exprimé et son activation hyperpolarise la membrane. Cette modification du potentiel de membrane va entraîner une augmentation du gradient électrochimique nécessaire à la sécrétion de  $\text{Cl}^-$ . Cette hyperpolarisation entraîne une diminution du gradient électrochimique du bicarbonate et à l'inverse du  $\text{Cl}^-$ , le bicarbonate est moins sécrété.

#### b) Régulation du volume cellulaire

Le canal IKCa est impliqué dans les flux ioniques au niveau de la membrane cellulaire comme nous venons de le voir. Depuis la mise en évidence du « canal de Gardos », il a été démontré que cette protéine intervenait dans la régulation du volume des globules rouges (Begenisich, T. *et al.*, 2004). Dans le contexte de l'anémie falciforme, ce rôle est amplifié par une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire qui provoque une sortie massive d'eau et ainsi un transport déficient de l' $\text{O}_2$  par l'hémoglobine (Bunn, H. F. 1997).

L'implication du canal IKCa dans la régulation du volume cellulaire a été décrit également dans les lymphocytes T, dans les hépatocytes et dans des cellules de types ostéoblastiques (Khanna, R. *et al.*, 1999; Weskamp, M. *et al.*, 2000; Barfod, E. T. *et al.*, 2007). Dans les lymphocytes T, le nombre de canaux exprimés à la membrane varie en fonction de l'état cellulaire. En effet, les cellules naïves vont exprimer une dizaine de canaux IKCa alors que les lymphocytes T activés vont présenter plusieurs centaines de ces canaux à la membrane (Khanna, R. *et al.*, 1999). Il a été montré que ce canal pouvait participer au retour à un volume normal de lymphocytes T suite à un choc hypotonique. Dans les cellules de type ostéoblastique, le canal IKCa peut également intervenir dans la régulation du volume cellulaire en association avec le canal BKCa (Weskamp, M. *et al.*, 2000).

#### c) Modulation de la prolifération cellulaire

L'activation du canal IKCa est à l'origine des oscillations calciques nécessaires à la prolifération ou à la production de cytokines dans les lymphocytes (Logsdon, N. J. *et al.*, 1997). Les mécanismes régulant les oscillations calciques induites par le canal IKCa sont élucidés progressivement et impliquent les CRAC (Ghanshani, S. *et al.*, 2000).

Le canal IKCa est impliqué dans la prolifération d'autres types cellulaires comme les fibroblastes ou les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) (Neylon, C. B. *et al.*, 1999; Pena, T. L. *et al.*, 1999). Les CMLV peuvent exister sous différents états : différenciées afin de remplir leur fonction contractile ou bien dédifférenciées permettant la réparation tissulaire.

En fonction de leur état, l'expression des canaux ioniques sera modifiée (Neylon, C. B. *et al.*, 1999). Dans les cellules différenciées, la fonction de prolifération est importante afin de reformer et réparer les tissus endommagés. Le canal IKCa en favorisant l'influx calcique participe à la prolifération de ces cellules.

#### d) Modulation du tonus vasculaire

Comme nous l'avons vu auparavant, le canal IKCa est co-exprimé dans les cellules endothéliales avec le canal SK3. Ces deux canaux sont des modulateurs importants de l'état de vasodilatation des vaisseaux.

Il est intéressant de noter que le canal IKCa possède des fonctions particulières dans le tissu vasculaire comparé au canal SK3. Il a par exemple été montré une implication de IKCa dans la régulation du flux sanguin au niveau du système coronarien contrairement à SK3 (Kurian, M. M. *et al.*, 2011). Le canal IKCa est exprimé de manière fonctionnelle dans la microvascularisation coronaire et son activation va provoquer une augmentation du flux sanguin *in vivo*. La vasodilatation induite par le canal IKCa est dépendante du NO (monoxyde d'azote) synthétisé par les cellules endothéliales. Cependant, le tonus basal des vaisseaux coronariens n'est pas contrôlé par le canal IKCa.

Une autre étude s'est intéressée à caractériser le rôle du canal IKCa dans les artérioles des muscles squelettiques (Wolfle, S. E. *et al.*, 2009). L'hyperpolarisation entraînant la dilatation de ces artérioles dépendante d'une stimulation à l'acétylcholine est principalement liée à l'activation du canal IKCa. Dans les souris déficientes pour le canal IKCa, le canal SK3 ne peut pas compenser l'absence du canal IKCa dans les artérioles. Par ailleurs, ces travaux ont montré que le canal IKCa participe au tonus basal de ces vaisseaux contrairement à SK3.

#### e) Régulation de la migration cellulaire

Le canal IKCa a été montré pour être impliqué dans la migration de différents types cellulaires. En présence d'acide lysophosphatidique (LPA), la vitesse de migration des cellules microgliales BV-2 est augmentée de trois fois et cette motilité est inhibée par l'application de clotrimazole ou de charybdotoxine, ce qui démontre l'implication du canal IKCa (Schilling, T. *et al.*, 2004). Dans ce modèle, il semble que l'activité de IKCa permette à la cellule de modifier son volume cellulaire et sa forme, ce qui est indispensable à la migration cellulaire.

La migration des mastocytes intervient dans l'initiation de différentes pathologies dont l'asthme. Il a été montré que CXCL10, une cytokine issue des cellules musculaires des voies aériennes, induisait la migration des mastocytes pulmonaires (Brightling, C. E. *et al.*, 2005). Les travaux de Cruse ont montré que le canal IKCa était impliqué dans la migration des mastocytes induite par CXCL10 suggérant que ce canal pouvait être utilisé comme cible thérapeutique dans l'asthme (Cruse, G. *et al.*, 2006). D'autre part, la migration des cellules dendritiques (DC) vers les ganglions lymphatiques est importante pour la régulation et l'activation des cellules immunitaires. Au niveau pulmonaire, la migration des DC a été montrée pour être dépendante du canal IKCa (Shao, Z. *et al.*, 2011). La sécrétion des cytokines nécessaires à l'activation de la migration des DC est associée à des conditions inflammatoires. En réponse à l'inflammation, les DC vont présenter une augmentation de l'expression du canal IKCa qui va favoriser leur migration et ainsi stimuler le système immunitaire.

Au niveau pulmonaire, l'équipe de E. Brochiero a démontré l'implication de canaux potassiques, dont le canal IKCa, dans la réparation de l'épithélium bronchique (Trinh, N. T. *et al.*, 2008). L'activité des canaux potassiques couplée à la signalisation de l'EGF est impliquée dans la réparation de l'épithélium pulmonaire. Dans le cas de cellules issues de patients atteints de mucoviscidose, ce mécanisme est diminué entraînant une défection du système de réparation.

En 1999, Schwab *et al.* ont montré que le canal IKCa régula la migration des cellules MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) (Schwab, A. *et al.*, 1999). En appliquant des conditions hypotoniques ou hypertoniques, ils ont reproduit les effets inhibiteurs ou activateurs du canal IKCa. Ces résultats indiquent que la régulation du volume cellulaire et donc de la forme des cellules sont des pré requis à la motilité cellulaire dépendante de IKCa, comme nous l'avons décrit dans la partie concernant la migration cellulaire.

#### 4. Rôles du IKCa dans les pathologies autres que le cancer

Nous avons évoqué l'augmentation de migration de la microglie dépendante de IKCa en présence de LPA (Schilling, T. *et al.*, 2004). Dans des conditions pathologiques, la microglie activée peut produire des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou des composés azotés pouvant conduire à la mort cellulaire des neurones environnants. Le canal IKCa, participant à l'activation de la microglie, est donc impliqué dans la neurodégénérescence due aux ERO et



aux composés azotés (Kaushal, V. *et al.*, 2007). Cela présente le canal IKCa comme une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de la neuroinflammation induite par la microglie.

Dans les pathologies du système cardiovasculaire, comme l'hypertension ou la resténose, la fonction ou l'expression du canal IKCa sont modifiées (Giachini, F. R. *et al.*, 2009). Ces éléments ont été développés dans la partie « Implication des canaux SKCa dans les pathologies cardiovasculaires », page 85.

L'implication du canal IKCa dans les phénomènes de migration, de prolifération ou bien de régulation du volume cellulaire indique que cette protéine peut devenir une cible potentielle dans les différentes pathologies présentées.

## 5. Rôles des canaux KCa dans le cancer

### a) Introduction

Comme nous l'avons précisé auparavant, les canaux ioniques sont impliqués dans de nombreuses pathologies. Depuis une quinzaine d'années, leurs rôles dans le cancer sont de plus en plus étudiés. La littérature concernant cette thématique comporte plusieurs revues récentes expliquant de manière détaillée le rôle de ces canaux dans les principaux phénomènes de prolifération, d'apoptose, de transition dans les phases du cycle cellulaire, de migration et d'invasion cellulaire (Le Guennec, J. Y. *et al.*, 2007; Fraser, S. P. *et al.*, 2008; Arcangeli, A. *et al.*, 2009; Prevarskaya, N. *et al.*, 2010).

L'étude de cette famille de protéines dans le cancer est très importante. En effet, l'implication d'un canal ionique dans une fonction de la cellule cancéreuse ouvre une nouvelle voie thérapeutique possible par l'utilisation d'une pharmacologie adaptée. D'autre part, l'expression anormale d'un canal dans un tissu donné pourrait être utilisé comme marqueur pronostique. Cependant, il est encore difficile de savoir si les canaux ioniques sont à l'origine des transformations cancéreuses ou bien si ils en sont la conséquence. Ceci pose également la question de savoir si les cancers peuvent être dénommés comme canalopathie ou non.

Depuis de nombreuses années, le rôle des canaux potassiques dans la prolifération cellulaire a été mis en évidence aussi bien dans les cellules normales que cancéreuses. Ainsi B. Nilius et W. Wohlrab ont montré en 1992 que la modulation pharmacologique de canaux potassiques

par le TEA ou par l'AMPc dans une lignée de mélanome (IGR1) modifiait la croissance cellulaire et l'incorporation de thymidine tritiée (Nilius, B. *et al.*, 1992). Depuis ces premières études, de nombreux canaux ioniques ont été impliqués dans la prolifération cellulaire : les canaux  $K_{ATP}$  dans les cellules de carcinomes mammaires MCF-7, les canaux potassiques dépendants du voltage dans les cellules LNCaP de cancer prostatique, des canaux de la famille des TRP comme le TRPM4 impliqué dans la prolifération des cellules HELA ou bien encore les canaux ClC-3 portant une conductance pour le chlore et qui sont sensibles au volume cellulaire (Skryma, R. N. *et al.*, 1997; Wang, Z. H. *et al.*, 2007; Xu, B. *et al.*, 2010; Armisen, R. *et al.*, 2011). Le  $Ca^{2+}$  régule le cycle cellulaire, l'apoptose, la prolifération. Les mécanismes proposés dans les études reliant les canaux ioniques et la prolifération seraient donc liés à l'homéostasie calcique : les canaux potassiques hyperpolarisent la membrane cellulaire et favorisent l'entrée de  $Ca^{2+}$ . La première démonstration du rôle d'un canal ionique dans le développement tumoral *in vivo* a été réalisée en 1999 par Pardo *et al.* (Pardo, L. A. *et al.*, 1999). Ils ont montré que le canal EAG favorise la prolifération de différentes cellules cancéreuses. Dans un modèle murin, ils ont été les premiers à montrer que des cellules exprimant le canal EAG proliféraient fortement et formaient des tumeurs à croissance rapide.

Une autre caractéristique importante des cellules cancéreuses est leur propriété à migrer et envahir les tissus environnants dans le but de former des métastases. L'étude de l'implication des canaux ioniques dans cette propriété est beaucoup plus récente. Ainsi, il a été démontré que les canaux sodiques dépendants du voltage étaient impliqués dans les propriétés invasives de cellules cancéreuses mammaires ou de prostate (Smith, P. *et al.*, 1998; Roger, S. *et al.*, 2003). Cependant comme dans le cas de la prolifération, des canaux ioniques différents ( $Cl^-$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ) ont été montrés pour intervenir dans la motilité et l'envahissement des tissus environnants (Kapoor, N. *et al.*, 2009; Sciacaluga, M. *et al.*, 2010). Notre équipe s'intéresse particulièrement au canal SK3. En effet, cette protéine a été identifiée comme un médiateur de la migration des cellules cancéreuses épithéliales mammaires MDA-MB-435s lors de la thèse de Marie Potier. Il s'agissait de la première description de l'implication des canaux SKCa dans la migration de cellules cancéreuses.

#### b) Implication des canaux KCa dans le cancer

Il a été rapporté que les canaux KCa régulent différentes fonctions cellulaires des cellules cancéreuses comme la migration, la prolifération ou la résistance à l'apoptose (Schwab, A. *et al.*, 1999; Ouadid-Ahidouch, H. *et al.*, 2004; Roger, S. *et al.*, 2004; Gessner, G. *et al.*, 2005;

Weaver, A. K. *et al.*, 2006; Khaitan, D. *et al.*, 2009). Cependant, il y a peu d'informations sur le rôle des SKCa dans les cellules cancéreuses. Il a été montré que le canal SK2 pouvait favoriser la prolifération de cellules de mélanomes sous certaines conditions (Tajima, N. *et al.*, 2006). En hypoxie ou en présence de composés mimant cette condition, les cellules IGR-31 surexpriment le canal SK2 et le canal IKCa qui en retour favorisent la prolifération cellulaire.

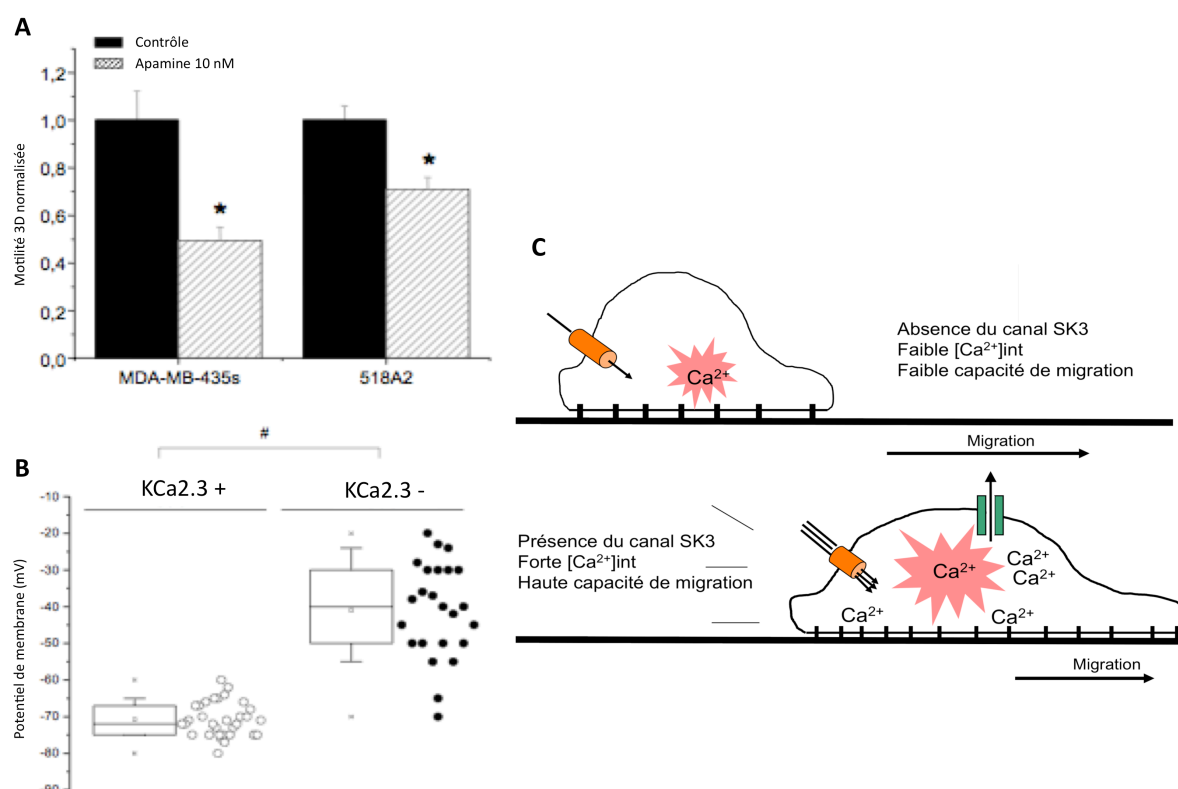
#### (i) Canal SK3 et cancer du sein

L'intérêt de notre groupe s'est porté sur le canal SK3. Ce canal a été trouvé exprimé de manière anormale dans la lignée cellulaire épithéliale cancéreuse mammaire réputée métastasiante, la lignée MDA-MB-435s, ainsi que dans des biopsies de tumeurs mammaires (Potier, M. *et al.*, 2006). A l'inverse, cette protéine n'est pas exprimée dans le tissu mammaire sain. Ce canal régule une fonction importante des cellules cancéreuses, la fonction de migration cellulaire. Dans le développement de métastases, la migration cellulaire est un phénomène primordial. De nombreux processus régissant la motilité cellulaire sont dépendants de la concentration calcique intracellulaire. Dans les cellules non excitables, les influx calciques peuvent être favorisés par les canaux potassiques, qui en hyperpolarisant la membrane entraînent une augmentation du gradient électrochimique pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . Dans les cellules MDA-MB-435s, le canal SK3 hyperpolarise les cellules ce qui régule la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et par conséquent la motilité de ces cellules cancéreuses (Figure 18A).

#### (ii) Canal SK3 et mélanome

Le mélanome est un cancer très agressif et les cellules doivent migrer pour envahir les différentes couches cutanées avant de s'échapper dans les vaisseaux puis envahir différents sites afin d'y former des tumeurs secondaires ou métastases. Ce type de tumeur est fortement réfractaire à toutes les thérapies actuellement utilisées. La compréhension des mécanismes régulant la motilité de ces cellules serait donc une opportunité et ouvrirait une nouvelle fenêtre thérapeutique. L'étude qui a été menée en 2009 sur différentes lignées de mélanomes a permis de montrer l'implication du canal SK3 dans la migration de ces cellules (Figure 18A) (Chantome, A. *et al.*, 2009). Comme dans le cas du cancer du sein, le canal SK3 apparaît lors de la transformation cancéreuse des cellules car les cultures primaires de mélanocytes n'expriment pas cette protéine. Il pourrait s'agir de la réexpression d'un gène embryonnaire. En effet, les cellules du derme ont pour origine la crête neurale comme de nombreuses

cellules matures exprimant le canal SK3. Dans les 4 lignées de mélanomes testées, 3 expriment ce canal. Dans les cellules exprimant cette protéine, l'application d'apamine entraine une diminution de 40 % de la motilité. Nous avons montré que l'hyperpolarisation dépendante du canal est le phénomène nécessaire à la régulation de la motilité (Figure 18B). Il a été montré précédemment dans d'autres types cellulaires de mélanome que le canal IKCa était impliqué dans la prolifération de ces cellules (Tajima, N. *et al.*, 2006). Dans nos conditions expérimentales, le canal IKCa et le canal SK3 ne régulent pas la prolifération de nos cellules de mélanomes.



**Figure 18. Implication du canal SK3 dans la motilité des cellules cancéreuses mammaires et de mélanomes.**

A. Effet de l'apamine sur la motilité de cellules cancéreuses mammaires (MDA-MB-435s) et de mélanomes (518A2). L'apamine appliquée à 10 nM diminue significativement la migration des cellules cancéreuses. B. Implication du canal SK3 dans le maintien du potentiel de membrane. Les cellules exprimant le canal SK3 fonctionnel possèdent un potentiel de membrane plus négatif que les cellules n'exprimant pas ce canal. C. Modèle proposé de l'implication du canal SK3 dans la motilité des cellules cancéreuses. A et B modifiés d'après Chantôme *et al.*, 2009. C. modifié d'après Potier *et al.*, 2006.

L'implication du canal SK3 dans la motilité des cellules cancéreuses peut être résumée de la manière suivante. L'activation du canal entraine une hyperpolarisation de la membrane ce qui augmente le gradient électrochimique du  $Ca^{2+}$  et a pour conséquence de le faire entrer dans la cellule par des canaux indépendants du voltage. Il est intéressant de noter que ces voies d'entrées du  $Ca^{2+}$  sont pour le moment inconnues mais que des études réalisées au laboratoire

sont en cours afin de les mettre en évidence. Cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  va exercer un rétrocontrôle positif sur le canal SK3, l'activer encore plus et amplifier le système. Ce mécanisme est présenté dans la Figure 18 (C).

### (iii) Canal SK3 et cancer du colon

Une autre étude conduite en collaboration avec Fabrice Pierre (INRA, Toulouse) a permis de montrer le rôle du canal SK3 dans le développement du cancer colo-rectal. Dans la cancérogénèse au niveau colique, la mutation du gène APC (Adenomatous Polyposis Coli) est considérée comme un événement précoce de la transformation des cellules cancéreuses. La protéine produite par ce gène a été montrée pour intervenir dans de nombreuses fonctions dont la migration cellulaire via la modulation du cytosquelette (Forest, V. *et al.*, 2003). Les cellules contrôles,  $\text{APC}^{+/+}$ , expriment le canal SK3 qui régule en partie leur migration. Dans un modèle cellulaire présentant la mutation du gène APC, les cellules  $\text{APC}^{\text{min}/+}$ , l'expression du canal SK3 est réduite et cette protéine n'est plus fonctionnelle (Potier, M. *et al.*, 2010). Le canal SK3 est donc un élément participant à la mise en place du phénomène pathologique en diminuant la capacité des cellules à migrer et peut être à se renouveler. A l'inverse des 2 premières démonstrations, il s'agit d'une diminution de l'activité et de l'expression qui est à l'origine du dysfonctionnement cellulaire et qui implique le canal SK3 dans un phénomène cancéreux.

### (iv) Canal IKCa et cancer

Le canal IKCa a été impliqué dans la prolifération de différentes cellules cancéreuses : prostate, leucémie, glioblastome, cancer du sein, pancréas ou encore endomètre (Parihar, A. S. *et al.*, 2003; Fioretti, B. *et al.*, 2004; Jager, H. *et al.*, 2004; Ouadid-Ahidouch, H. *et al.*, 2004; Wang, Z. H. *et al.*, 2007). Le mécanisme impliqué dans les différentes études serait le même que pour les cellules normales. Le canal IKCa, en étant activé, hyperpolarise la membrane plasmique ce qui favorise l'influx du  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur de la cellule. L'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire étant impliquée dans la progression du cycle cellulaire, ceci indique que l'activation de IKCa va favoriser la prolifération des cellules cancéreuses. Par exemple, pour le cancer de la prostate, une voie d'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  associée à IKCa et impliquée dans la prolifération cellulaire est le TRPV6 (Lallet-Daher, H. *et al.*, 2009).

D'autre part, l'équipe de Schwab a démontré l'implication du canal IKCa dans la migration de cellules de mélanomes (Schwab, A. *et al.*, 1999). L'utilisation de ChTx provoque un

ralentissement de la migration des cellules de mélanomes. Le mécanisme suggéré est que l'application de ChTx provoque une dépolarisation de la membrane diminuant le gradient électrochimique nécessaire à l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ . Il n'est cependant pas certain que le canal IKCa soit impliqué en raison du manque de spécificité de la ChTx. Récemment, il a été montré que le canal IKCa était associé à la sécrétion de la Melanoma inhibitory activity (MIA), une protéine favorisant la migration des cellules de mélanomes (Schmidt, J. *et al.*, 2010). Dans cette étude, il est montré que l'hyperpolarisation induite par le canal augmente la concentration calcique intracellulaire. Ceci va permettre la fusion des vésicules contenant la MIA avec la membrane plasmique et provoquer son relargage à l'extérieur de la cellule. La conséquence de la libération de la MIA est une augmentation de la migration des cellules.

### III. Rôles des éther-lipides dans le cancer : modulateurs du transportome

#### A. Généralités

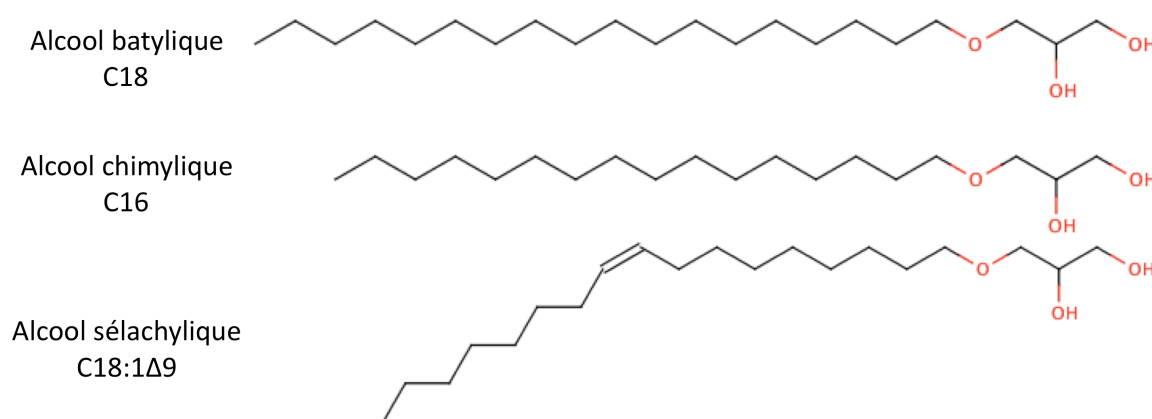
Depuis plusieurs décennies, la famille des composés lipidiques bioactifs augmente progressivement. Toutes les cellules possèdent des lipides et des phospholipides qui sont des composants essentiels des membranes. En plus d'être des éléments structuraux, les lipides membranaires peuvent être des précurseurs de médiateurs et de messagers secondaires. Ils participent ainsi à la communication intercellulaire ou à la signalisation intracellulaire.

Je vais d'abord décrire les composés, les structures et les termes que j'utiliserai par la suite. Je m'intéresserai aux éther-lipides qui peuvent être d'origine naturelle ou synthétique.

Les éther-lipides naturels sont soit des triglycérides soit des phospholipides possédant une chaîne longue d'alcool gras liée au glycérol par une liaison éther. Ce type de liaison est plus stable que les liaisons esters qui sont plus facilement dégradées. Dans les membranes cellulaires, deux formes majeures d'éther-lipides naturels sont présentes : les alkyl-lipides et les alkényl-lipides que l'on appelle également plasmalogènes. Dans le cas des alkyl-lipides, il existe une liaison éther entre la chaîne d'alcool gras et le squelette glycérol. Pour les alkényl-lipides, il s'agit d'une liaison vinyl-éther qui relie le glycérol à la chaîne. Au niveau du squelette glycérol, j'utiliserai la recommandation de la commission IUPAC-IUB sur la nomenclature biochimique qui a retenu le système « stereospecific numbering » ou *sn* pour situer les différents éléments liés au glycérol (IUPAC-IUB, C. 1978). Par exemple, les chaînes d'alcool gras sont situées en *sn*-1 ou *sn*-2 et le groupement phosphocholine en *sn*-3.

Pour les éther-lipides synthétiques, le terme alkyl-lipide est également utilisé afin d'inclure des composés ne présentant pas de liaison éther. Les alkyl-lipides synthétiques regroupent les alkyl-glycérophospholipides ou APL (par exemple, l'édelfosine) et les alkyl-phosphocholines ou APC (ex : la miltéfosine) (van Blitterswijk, W. J. *et al.*, 2008).

Au cours des années 1920, Tsujimoto et Toyama ont mis en évidence dans l'huile de foie d'élaémobranch (groupe auquel appartiennent les requins et les raies) des triglycérides possédant une liaison éther entre l'atome de carbone *sn*-1 du glycérol et une longue chaîne d'alcool gras (Taguchi, H. *et al.*, 1998). Trois composés obtenus après hydrolyse des résidus acides gras en *sn*-2 et *sn*-3 furent baptisés en fonction de l'espèce de poisson dont ils provenaient bien que leurs structures ne furent pas encore complètement définies à cette époque : l'alcool chimylique (extrait de la chimère), l'alcool sélachylique (extrait du sélache ou requin pèlerin) et l'alcool batylique (extrait d'une raie dont l'ordre est Batoidie) (Figure 19).



**Figure 19. Ether-lipides extraits de l'huile de foie d'élaémobranches.**

Alcool batylique : 1-O-Octadecylglycérol ; Alcool chimylique : 1-O-Hexadecylglycérol ; Alcool sélachylique : 1-O-9-enylglycérol.

Les premières fonctions physiologiques de ces composants ont été mises en évidence dans les années 1950. Linman *et al.* ont montré que l'alcool batylique stimulait l'hématopoïèse (Linman, J. W. *et al.*, 1958). Simultanément, A. Brohult montrait qu'un apport en alcool sélachylique pouvait protéger de la leucopénie et de la thrombopénie développées suite au traitement de cancers par irradiation (Brohult, A. 1958). L'apport de ces composés devait être dosé précisément car au dessus d'une certaine concentration l'effet diminue (effet en cloche). Suite à ces premiers constats et à des études décrivant l'immunostimulation dépendante de la lysophosphatidylcholine (LPC), des équipes ont essayé de synthétiser des analogues de ces molécules naturelles afin d'obtenir des composés immunostimulants plus stables (Eibl, H. *et al.*, 1967). En remplaçant les liaisons esters par des liaisons éthers sur les atomes de carbone 1 et 2 de la LPC, ils ont synthétisé des analogues qui n'avaient pas l'activité immunomodulatrice souhaitée par les auteurs. Ces composés présentaient, par contre, une activité anti-tumorale *in vitro* et *in vivo* (Andreesen, R. *et al.*, 1978; Modolell, M. *et al.*,



1979). C'est de cette manière que l'édelfosine a été synthétisée. Ces premières études ont montré que les éther-lipides synthétiques présentaient une spécificité envers les cellules leucémiques comparées aux cellules normales (Andreesen, R. *et al.*, 1978).

Au début des années 1970, J. Benveniste a mis en évidence le facteur d'activation plaquettaire ou PAF (Platelet Activating Factor) (Benveniste, J. *et al.*, 1972; Benveniste, J. 1974). Ce lipide est un médiateur important de l'activation des basophiles, des mastocytes et de l'agrégation plaquettaire. La structure de ce composé a été présentée en 1979 par Demopoulos (Figure 22) (Demopoulos, C. A. *et al.*, 1979). Ce travail décrit une nouvelle classe de médiateur lipidique. Le composant actif du PAF, qui correspond à l'activité biologique d'activation des cellules (plaquettes, mastocytes), appartient à la famille des éther-lipides. Ce composé présente de nombreuses activités physiologiques ou physiopathologiques : inflammation, apoptose, angiogenèse... (pour revue (Stafforini, D. M. *et al.*, 2003)). Sa structure est présentée dans la figure 22. Il est également nommé de PAF acéther. Ce nom lui vient de sa structure : ac- pour le groupement acétyle situé sur le *sn*-2 du glycérol et éther pour la liaison éther reliant le squelette glycérol à l'alcool à chaîne longue. Il est important de noter que le PAF est le nom donné à l'activité biologique mais qu'il peut recouvrir plusieurs composés de structures très proches (modifications de la longueur de la chaîne en *sn*-1, nombre d'insaturations). L'activité du PAF sera différente en fonction de ces modifications. Le PAF active également les canaux potassiques TREK-1 (TWIK1-related K<sup>+</sup> channel) et TRAAK (Twik-related arachidonic acid-stimulated K<sup>+</sup> channel) (Maingret, F. *et al.*, 2000). Le PAF et la LPC possèdent une forme de cône. En s'intégrant dans la membrane, ils provoquent une courbure de la membrane et activent ces canaux ioniques.

## B. Les éther-lipides naturels

Les éther-lipides (alkylacylglycéro-phospholipides) sont des composants présents naturellement dans les membranes cellulaires mais représentent une fraction beaucoup moins importante que les ester-lipides (diacylglycéro-phospholipides). La présence des éther-lipides dans les différents tissus humains n'est cependant pas uniforme : le cerveau et le cœur comprennent entre 20 % et 25 % d'éther-lipides dans leurs membranes (Diagne, A. *et al.*, 1984). La membrane de l'acrosome des spermatozoïdes peut contenir jusqu'à 50 % d'éther-lipides (Evans, R. W. *et al.*, 1980; Mangold, H. K. *et al.*, 1983). Le lait maternel et la moelle osseuse contiennent également des taux élevés d'éther-lipides. L'huile de foie de requin peut

contenir jusqu'à 45 % d'éther-lipides sous la forme de triglycérides (Malins, D. C. *et al.*, 1965)

## 1. Origine et métabolisme des éther-lipides naturels

Les éther-lipides proviennent soit de l'alimentation soit de la synthèse endogène.

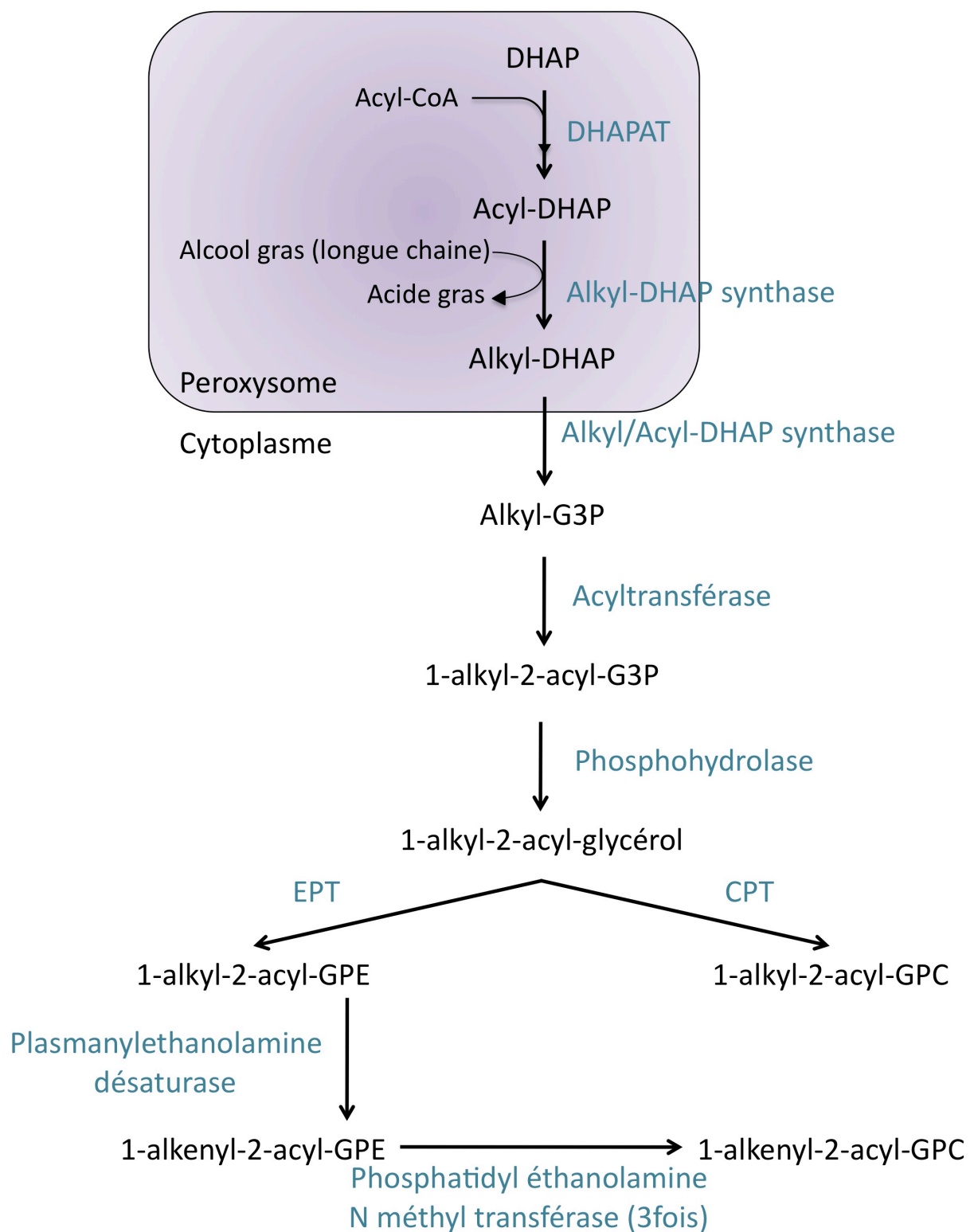
### a) Apport alimentaire

Les aliments provenant d'animaux marins ou terrestres apportent des éther-lipides. Les végétaux n'en contiennent pas ou très peu. Des études ont montré qu'un enrichissement de l'alimentation en éther-lipides pouvait modifier la composition lipidique de différents organes (Blank, M. L. *et al.*, 1991). Dans le foie, les reins ou les poumons de rats, la supplémentation entraînait une augmentation des éther-lipides mais ne modifiait pas les proportions des classes majeures de phospholipides membranaires (phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylsérine (PS) et sphingomyéline (SM)). Cependant, il a été montré que l'apport d'éther-lipides *per os* n'est pas l'origine principale des éther-lipides retrouvés dans l'organisme (Ahrne, L. *et al.*, 1982). Une très petite partie de la dose d'éther-lipide administrée (entre 1 et 5 %) est retrouvée sous la forme d'éther-lipide dans les tissus de jeunes rats.

L'apport alimentaire n'est pas suffisant pour subvenir aux besoins de l'organisme. Dans certaines pathologies comme le syndrome de Zellweger ou la chondrodysplasie ponctuée rhizomélisque, la voie de biosynthèse (décrite ci-après) n'est plus fonctionnelle (Gorgas, K. *et al.*, 2006). Un apport supplémentaire en éther-lipides permet une augmentation du taux de plasmalogènes mais n'est pas suffisant pour combler la carence (Das, A. K. *et al.*, 1992). La multitude de troubles métaboliques associés continue à affecter les patients.

### b) Biosynthèse

La biosynthèse endogène est la principale voie d'apport d'éther-lipides. L'initiation de cette synthèse est réalisée dans les peroxysomes puis dans le cytoplasme. La biosynthèse comporte six et sept étapes pour les alkyl-glycérophospholipides et les alkényl-glycérophospholipides respectivement (Figure 20) (Nagan, N. *et al.*, 2001; Wanders, R. J. *et al.*, 2006).

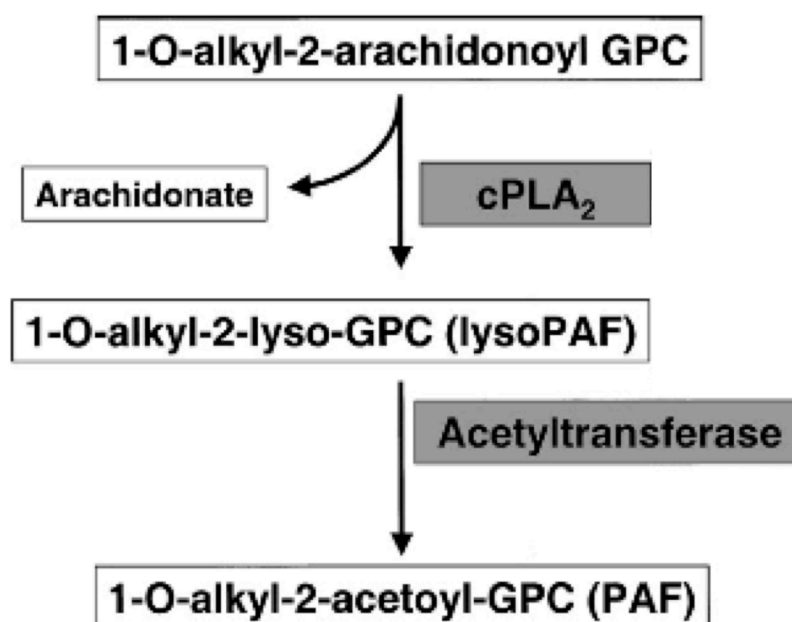


**Figure 20. Voie de biosynthèse des éther-lipides.**

DHAP : Dihydroxyacétone phosphate ; DHAPAT : Dihydroxyacétone phosphate acyltransférase ; G3P : Glycérol-3-phosphate ; EPT : CDP-éthanolamine diacylglycérol éthanolaminephosphotransférase ; CPT : CDP-choline diacylglycérol cholinephosphotransférase ; GPE : Glycérophosphoéthanolamine ; GPC : Glycérophosphocholine. Modifié d'après Wanders and Waterham, 2006.

### (i) Biosynthèse du PAF

Le PAF est synthétisé par la « voie de remodelage des phospholipides membranaires » (Stafforini, D. M. *et al.*, 2003) (Figure 21). Cette voie est activée par des facteurs pro-inflammatoires ou l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. La première étape est la formation du lysoPAF ou 1-O-alkyl-2-lyso-glycéro-phosphocholine par la phospholipase A2 (PLA2). Le lysoPAF est ensuite acétylé par une acétyl transférase pour former le PAF. Le PAF peut être dégradé à nouveau en lysoPAF.



**Figure 21. Voie de synthèse du PAF.**

GPC : glycérophosphocholine, cPLA<sub>2</sub> : phospholipase A2 cytosolique. Modifié d'après Stafforini *et al.*, 2003.

### (ii) Catabolisme des éther-lipides

Les éther-phospholipides sont dégradés en deux étapes. Tout d'abord, la PLA2 va cliver la liaison ester en position *sn*-2 (formation de 1-O-alkyl-2-lyso-glycérophospholipide) et les phospholipases C (formation de 1-O-alkyl-glycérol) ou D (formation d'acide lysophosphatidique) cliveront la tête polaire. Ces composés sont utilisés dans la voie de remodelage. La liaison éther située en *sn*-1 est clivée par l'alkyl-mono-oxygénase (Kaufman, S. *et al.*, 1990). Elle libère un aldéhyde gras qui pourra être réduit en alcool gras ou oxydé en acide gras.

## 2. Rôles physiopathologiques des éther-lipides naturels

L'apport d'éther-lipides réalisé lors de différentes études a permis de découvrir les nombreuses fonctions que pouvaient avoir ces lipides.

### a) Incorporation membranaire pour la synthèse de médiateurs cellulaires

Dans différents modèles cellulaires *in vitro*, il a été montré que l'apport d'éther-lipides pouvait modifier la synthèse de médiateurs lipidiques. Dans les cellules THP-1 (cellules monocytaires de leucémie humaine), les alkyl-glycérols apportés dans le milieu de culture s'incorporent dans la membrane et augmentent la synthèse de PAF (Hichami, A. *et al.*, 1997). Cependant, le type de chaîne située en *sn*-1 des alkyl-glycérols peut modifier la composition du PAF et ainsi son activité.

Dans des cellules endothéliales porcines, l'équipe de Legrand a montré l'influence de l'incorporation d'éther-lipides naturels sur la perméabilité endothéliale (Marigny, K. *et al.*, 2002). L'incorporation des alkyl-glycérols naturels dans ces cellules entraîne la formation de 1-O-alkyl-2-acyl-*sn*-glycérol qui est un analogue des diacylglycérols (DAG). Ce composé inhibe l'activité des PKCs qui sont d'importants médiateurs de la perméabilité de l'endothélium. De précédentes études avaient déjà montré la régulation de l'activité des PKCs par les alkyl-lipides. En 1987, Heymans a réalisé une étude de la relation entre la structure et l'activité en modifiant les 2 liaisons esters du DAG par des liaisons éthers et testant les différentes espèces moléculaires de diglycérides (diacylglycérols, dialkylglycérols, alkylacylglycérols, acylalkylglycérols) (Heymans, F. *et al.*, 1987). Si le composé analogue au DAG présente une liaison éther au niveau de l'atome de carbone *sn*-1 du glycérol, l'activité des PKCs est diminuée. A l'opposé, la présence d'une liaison éther en *sn*-2 n'affectait pas l'activité des PKCs.

Les éther-lipides peuvent également être impliqués dans des phénomènes pathologiques. La dislocation des plaques d'athérome entraîne la libération d'éther-lipides (Kamido, H. *et al.*, 2002). Il s'agit de glycéro-phospholipides présentant une liaison éther en *sn*-1. Ces composés entraînent l'agrégation plaquettaire et inhibent la relaxation dépendante de l'endothélium, favorisant la formation de thrombus.

### b) Ether-lipides et fertilité masculine

Différentes études ont été conduites sur les spermatozoïdes de porc afin d'observer les effets des éther-lipides (Cheminade, C. *et al.*, 2002; Mitre, R. *et al.*, 2004). Il a d'abord été montré qu'un traitement des spermatozoïdes *in vitro* avec les alkyl-glycérols entraînait une augmentation de la motilité et que cet effet était inhibé par l'utilisation d'un antagoniste du récepteur au PAF (Cheminade, C. *et al.*, 2002). Des effets similaires avaient déjà été montrés *in vitro* avec des spermatozoïdes humains (Krausz, C. *et al.*, 1994). Dans l'étude de Cheminade (Cheminade, C. *et al.*, 2002), il a été démontré que l'apport d'alkyl-glycérols entraînait une augmentation de la quantité de lysoPAF mais ne modifiait pas la synthèse du PAF à la différence des cellules THP-1 (Hichami, A. *et al.*, 1997). Les effets des éther-lipides semblent donc être différents selon les tissus. Enfin, l'application d'alkyl-glycérols naturels pendant 3 à 5 jours sur des spermatozoïdes servant à l'insémination artificielle de truies a permis une augmentation de la fertilisation (Cheminade, C. *et al.*, 2002). Quelques années plus tard, la même équipe a montré *in vivo* que les bénéfices des alkyl-glycérols pouvaient être retrouvés suite à un apport alimentaire (Mitre, R. *et al.*, 2004). Il est à noter que dans cette dernière étude, les auteurs ont utilisé de l'huile de foie de requin qui ne contient pas uniquement des éther-lipides mais également des acides gras insaturés n-3. Les éther-lipides peuvent donc participer à ces effets bénéfiques par voie alimentaire mais les acides gras insaturés y sont associés (Wathes, D. C. *et al.*, 2007).

### c) Immunostimulation et hématopoïèse

La stimulation de l'hématopoïèse par l'alcool batylique a été démontrée très tôt (Linman, J. W. *et al.*, 1959). Il a été ensuite décrit que l'utilisation d'éther-lipides pouvait stimuler la production d'anticorps (Ngwenya, B. Z. *et al.*, 1991). Il a été montré que dans l'inflammation cancéreuse, les cellules lysées pouvaient relarguer une partie de leurs composés membranaires, dont des éther-lipides, et stimuler la phagocytose des macrophages (Yamamoto, N. *et al.*, 1988). Cet effet a été mimé chez des souris en leur injectant des éther-lipides par voie intra péritonéale. Leurs macrophages présentaient une activité de phagocytose deux fois plus importante que le niveau basal.

L'activation de l'hématopoïèse et l'immunostimulation ont également été observées *in vivo* chez la truie gestante et les porcelets nouveaux nés. (Mitre, R. *et al.*, 2005). Ainsi, une supplémentation alimentaire d'huile de foie de requin augmentait le nombre de globules rouges et le taux d'immunoglobulines (Ig) spécifiques en réponse à la vaccination pour la

maladie d'Aujeszky. L'augmentation d'Ig était retrouvée dans le colostrum et le lait. La descendance issue du groupe supplémenté présente une augmentation des leucocytes et particulièrement des monocytes. La supplémentation de l'alimentation de la mère a également augmenté le taux d'IgG et d'Ig spécifiques de la maladie d'Aujeszky chez les porcelets. Comme dans les études concernant la fertilité masculine (Mitre, R. *et al.*, 2004), ces résultats sont à nuancer en raison de la présence d'acides gras insaturés dans l'huile de foie de requin.

#### d) Activité anti-tumorale des éther-lipides naturels

En 1978, Brohult *et al.* ont montré qu'un apport d'alkyl-glycérols extraits d'huile de foie de requin avant la radiothérapie entraînait une diminution de la progression tumorale chez des patientes atteintes d'un cancer du col de l'utérus (Brohult, A. *et al.*, 1978). Ils ont montré par la suite que cet apport précédant la radiothérapie diminuait la progression vers un stade plus avancé et la mortalité en plus de prévenir la leucopénie et la thrombocytopénie dues aux radiations (Brohult, A. *et al.*, 1986).

Plus récemment, des études sur le carcinome pulmonaire de Lewis chez la souris ont montré que l'activité anti-tumorale de l'huile de foie de requin était bien liée à leur contenu en éther-lipides (Pedrono, F. *et al.*, 2004). Dans ce travail, il est présenté une comparaison entre l'huile de foie de requin et les alkyl-glycérols purifiés. Ces éther-lipides purifiés entraînaient une inhibition de la croissance tumorale ainsi qu'une diminution de l'incidence des métastases aussi efficace que l'huile de foie de requin.

*In vitro*, il a également été montré que l'utilisation d'alkyl-glycérols pouvait réduire la prolifération des cellules endothéliales tumorales dépendante du bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) (Pedrono, F. *et al.*, 2007).

#### e) Autres fonctions

Les éther-lipides, et plus particulièrement les plasmalogènes, ont été impliqués dans la protection des cellules contre la production d'espèces réactives de l'oxygène induite par l'irradiation UV (Zoeller, R. A. *et al.*, 1988), et joueraient le rôle d'antioxydant endogène (Zoeller, R. A. *et al.*, 1999). Ils sont également engagés dans le transport et le maintien des stocks intracellulaires du cholestérol mais les mécanismes ne sont pas encore clairement établis. (Mandel, H. *et al.*, 1998; Maeba, R. *et al.*, 2003; Munn, N. J. *et al.*, 2003).

## C. Les éther-lipides anticancéreux synthétiques

Les agents anticancéreux conventionnels ciblent majoritairement l'ADN et provoquent de nombreux effets secondaires sur les tissus sains contrairement aux éther-lipides, qui de part leur nature lipidique amphiphile, ciblent préférentiellement la membrane cellulaire. De plus, les éther-lipides synthétiques semblent spécifiques des cellules tumorales (Mollinedo, F. *et al.*, 1997).

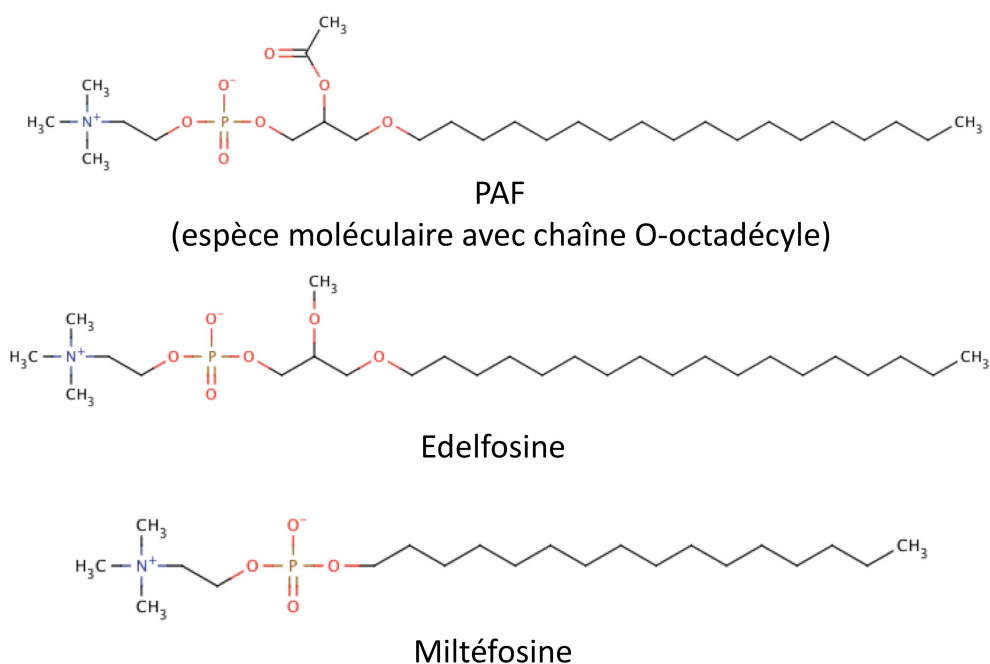
### 1. Mise en évidence des effets anticancéreux et utilisation d'éther-lipides synthétiques

Les effets anticancéreux des éther-lipides naturels ont été montrés pour la première fois à la fin des années 1950 (Brohult, A. 1958). La synthèse de composés analogues de la lysophosphatidylcholine a permis par la suite de mettre en évidence une série de composés synthétiques stables et présentant une forte action anti-tumorale. Le but initial de ces expériences était de synthétiser de nouveaux composés immunostimulants plus stables (substitution de la liaison ester et du groupement hydroxyle de la LPC par des groupements liés au glycérol par des liaisons éthers) et capables de stimuler les macrophages. Deux classes majeures de composés ont été décrites : les alkylglycérophospholipides (APL) et les alkylphosphocholines (APC). Les APL ont une structure proche du PAF et le prototype de cette classe est l'édelfosine (nommée également ET18-O-CH<sub>3</sub> ou 1-O-octadécyl-2-O-méthyl-rac-glycéro-3-phosphocholine) (Figure 22). Les APC ne présentent pas de squelette glycérol. La miltéfosine (hexadécylphosphocholine), qui ne possède pas de liaison éther, est le composé modèle de cette classe. Il s'agit d'une chaîne à 16 atomes de carbone liée à un groupement phosphocholine (Figure 22). Après l'obtention de ces premiers lipides synthétiques, de nombreux travaux ont été réalisés afin de comprendre leur mode d'action et d'optimiser ces structures pour obtenir les meilleurs effets anti-tumoraux.

La présence d'une longue chaîne carbonée permet une insertion facilitée dans la membrane plasmique. Le substituant à chaîne très courte en *sn*-2 et la nature zwitterionique des éther-lipides leur confèrent des propriétés détergentes qui peuvent expliquer leurs propriétés cytolytiques à hautes concentrations. Il a été montré que l'édelfosine non incorporée dans la bicouche lipidique de liposome pouvait entraîner une hémolyse *in vivo* dès l'injection de 12,5 mg/kg par voie intraveineuse (Ahmad, I. *et al.*, 1997). Sa toxicité est fortement diminuée quand elle est sous forme de liposome avec d'autres lipides. Les concentrations utilisées en



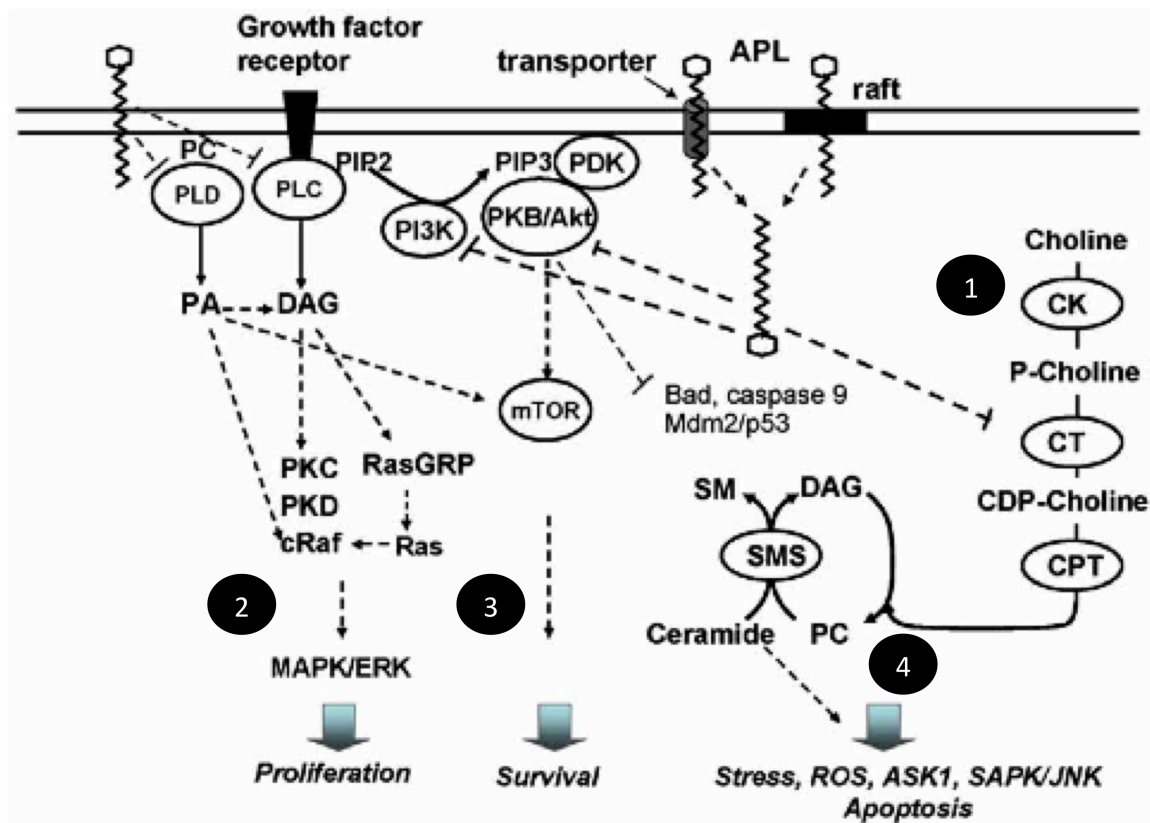
clinique sont inférieures aux concentrations entraînant l'effet détergent. Cela suggère que l'activité anti-tumorale ne passe pas par un effet détergent cytolytique. De nombreux groupes se sont donc attachés à décrire les effets provoqués par ces éther-lipides anticancéreux et leurs mécanismes d'actions. Par ailleurs, les éther-lipides présentent l'avantage de cibler spécifiquement les cellules tumorales. En effet, l'édelfosine entraîne l'apoptose de cellules provenant de patients leucémiques mais n'a aucun effet sur les cellules de donneurs sains (Mollinedo, F. *et al.*, 1997).



**Figure 22. Structures du PAF, de l'édelfosine et de la miltéfosine.**

## 2. Mécanismes d'actions

Les éther-lipides synthétiques s'intègrent dans les membranes cellulaires et interfèrent avec la biosynthèse et le renouvellement des phospholipides naturellement présents mais ils modulent également l'activité de certaines voies de signalisation. Plusieurs revues présentent de manière exhaustive les différentes voies modulées par les APL (van Blitterswijk, W. J. *et al.*, 2008; Danker, K. *et al.*, 2010). Certaines de ces voies sont présentées dans la figure 23.



**Figure 23. Schéma présentant quelques voies affectées par les APL.**

1 : Inhibition de la voie de synthèse des phosphatidylcholines. 2, 3 et 4 : Altération des voies de signalisation de prolifération MAPK/ERK, de survie PI3K/PKB/AKT et d'induction de l'apoptose SAPK/JNK. PC : Phosphatidylcholine ; PLC, PLD : Phospholipase C/D ; PIP2/3 : phosphatidylinositol di- ou tri- phosphate ; PI3K : phosphoinositide 3-kinase ; PKB/Akt : protéine kinase B ; PA : acide phosphatidique ; DAG : diacylglycérol ; PKC/D : protéines kinases C/D ; MAPK : mitogen-activated protein kinase ; ERK : extracellular signal-regulated kinase ; mTOR : mammalian Target of Rapamycin ; PDK : pyruvate déshydrogénase kinase ; SM : sphingomyéline ; SMS : sphingomyéline synthase ; CK : choline kinase ; CT : CTP : phosphocholine cytidylyltransferase ; CPT : choline phosphotransférase ; ROS : Reactive Oxygen Species (Espèces Réactive de l'Oxygène, ERO) ; ASK1 : Apoptosis signal-regulating kinase 1 ; SAPK : Stress-activated protein kinase ; JNK : Jun N-terminal kinase. Extrait de van Blitterswijk and Verheij, 2008.

Il a ainsi été démontré que l'une des cibles majeures des APL est la voie de biosynthèse de la phosphatidylcholine (PC). La PC est le phospholipide le plus abondant dans les cellules et en plus d'être un composant de la membrane, elle sert également de précurseur à différents messagers comme les DAG ou les acides phosphatidiques. Un blocage dans la voie de synthèse de cet élément structural impose donc un stress important à la cellule et peut provoquer son apoptose. Les APL bloquent la voie de synthèse au niveau de la CTP : phosphocholine cytidylyltransférase (CT) (Boggs, K. P. *et al.*, 1995). Il a ainsi été montré que l'édelfosine entraîne l'inhibition de la translocation de la CT du cytosol vers la membrane, étape limitante de la synthèse des PC (Tronchere, H. *et al.*, 1991). Il est également connu que la diminution du taux de PC dans une cellule entraîne son engagement dans une voie apoptotique (Cui, Z. *et al.*, 1996). Dans cette étude, l'utilisation de cellules mutantes qui

présentent une CT sensible à la température a permis de montrer que le blocage de la voie de synthèse *de novo* des PC provoquait différents phénomènes distinctifs de l'apoptose : fragmentation de l'ADN, diminution du nombre de cellules en phase S et conservation de l'intégrité de la membrane durant la mort cellulaire. Ceci permet d'expliquer le mécanisme par lequel l'édelfosine provoque l'apoptose des cellules en inhibant la voie de synthèse des PC.

Les APL interviennent sur différentes voies de signalisation cellulaire : la voie MAPK/ERK, la voie PI3K/PKB/Akt ou bien la voie SAPK/JNK. Il a ainsi été montré que l'édelfosine pouvait interférer avec certains éléments de la voie MAPK/ERK comme les phospholipases produisant le DAG ou bien avec la kinase Raf-1 (Zhou, X. *et al.*, 1996). Le signal de prolifération par cette voie étant inhibé, la cellule est orientée vers l'apoptose. Dans des cellules leucémiques, l'édelfosine inhibe la PI3K (Beneteau, M. *et al.*, 2008). Cette kinase qui est activée de manière constitutive dans différentes lignées cellulaires de leucémies intervient dans les phénomènes de survie ou de prolifération. Son inhibition par l'édelfosine engage la cellule leucémique vers l'apoptose. Les ALP et APC sont aussi capables d'activer la signalisation passant par SAPK/JNK (Ruiter, G. A. *et al.*, 1999). Cette voie est habituellement activée dans des conditions de stress et provoque l'apoptose de la cellule. L'utilisation d'édelfosine ou de miltéfosine provoque l'activation de cette voie dans des cellules leucémiques sans affecter les cellules saines.

En plus de leurs activités anti-tumorales, les ALP ont montré des propriétés de radiosensibilisation. La première démonstration de cette propriété a été réalisée avec la miltéfosine sur différentes lignées cellulaires (Bruyneel, E. A. *et al.*, 1993). Dans les cellules exprimant l'oncogène ras, le traitement des cellules avec la miltéfosine entraîne une diminution de la radiorésistance. Cette activité de sensibilisation a été démontrée par la suite pour d'autres composés comme l'édelfosine ou bien l'érucylphosphocholine (Ruiter, G. A. *et al.*, 1999; Rubel, A. *et al.*, 2006).

### 3. L'édelfosine

L'édelfosine appartient à la classe des ALP et a été le composant le plus étudié. Sa structure est très proche de celle du PAF : le PAF présente un groupement acétyle en *sn-2* alors que pour l'édelfosine, il s'agit d'un groupement méthoxy (Figure 22).

#### a) Métabolisme de l'édelfosine

La présence des deux liaisons éther de l'édelfosine est responsable de sa très grande stabilité. On retrouve 98 % d'édelfosine non métabolisée 24 heures après son administration à des cellules cancéreuses (Magistrelli, A. *et al.*, 1995).

L'édelfosine peut être dégradée par plusieurs enzymes :

- clivage de la liaison éther en *sn*-1 par la glycéryl-éther mono-oxygénase ; les produits libérés sont le 1-lyso-2-O-méthyl-phosphatidylcholine et l'alcool stéarique
- hydrolyse par la phospholipase C (PLC) qui va former le 1-O-alkyl-2-O-méthylglycérol et la phosphocholine
- hydrolyse par la phospholipase D (PLD) qui libère l'acide 1-O-alkyl-2-O-méthyl-phosphatidique et la choline.

Le clivage par la glycéryl-éther mono-oxygénase est peu efficace dans de nombreuses cellules. Le métabolisme de l'édelfosine est principalement réalisé par les PLC et PLD. D'autre part, les résultats présentés par Magistrelli en 1995 apportent des informations sur le métabolisme et l'activité de l'édelfosine (Magistrelli, A. *et al.*, 1995). L'édelfosine est très peu dégradée dans les cellules cancéreuses leucémiques ou dans les cellules de cancer du colon. Cette information indique que l'édelfosine agit directement et qu'elle n'a pas besoin d'être dégradée pour être active. Il a également été constaté que son activité *in vivo* était moins importante que sur des cellules en culture. Cela indique que lors de l'apport de l'édelfosine (quel que soit le mode d'administration), il existe une dégradation par un organe de l'animal. Une partie de l'explication a été montrée *in vitro* sur une culture cellulaire d'hépatocytes. Après 24 heures d'incubation au contact d'hépatocytes, plus de 50 % de l'édelfosine était dégradée (Magistrelli, A. *et al.*, 1995). Les cellules saines semblent capables de dégrader l'édelfosine contrairement aux cellules tumorales, ce qui pourrait expliquer en partie la diminution d'activité *in vivo*. Dans les cellules cancéreuses, il a été montré que la différence de dégradation des éther-lipides dans différentes lignées n'était pas corrélée à la sensibilité à l'édelfosine (Zhou, X. *et al.*, 1992).

Les cellules cancéreuses contiennent plus d'éther-lipides membranaires que les cellules non cancéreuses (Mangold, H. K. *et al.*, 1983) mais aucune étude n'a décrit précisément ce paramètre. Cette information est essentielle pour améliorer la compréhension des mécanismes d'actions des éther-lipides. Cette différence pourrait s'expliquer par une différence de métabolisme entre les cellules saines et les cellules cancéreuses. Une autre possibilité pouvant expliquer la différence de contenu cellulaire en éther-lipide serait l'existence d'un

transporteur membranaire ou d'un récepteur qui ne serait pas présent ou inactif dans les cellules saines.

#### b) Activités anti-tumorales de l'édelfosine

L'édelfosine inhibe la croissance tumorale selon les mécanismes d'actions généraux des ALP. Les études approfondies de ce composé ont permis de décrire ses activités anti-tumorales ainsi que ses mécanismes d'action.

L'édelfosine inhibe la prolifération et est capable de moduler la progression dans le cycle cellulaire. Cette activité est dépendante du type cellulaire. Dans les cellules de carcinomes pulmonaires non à petites cellules, l'édelfosine provoque un arrêt du cycle en phase G2/M et une augmentation significative de l'apoptose qui ne sont pas retrouvés dans les cellules de carcinomes à petites cellules (Shafer, S. H. *et al.*, 2003). Dans d'autres types cellulaires, le blocage du cycle cellulaire peut se réaliser dans la phase G0/G1. Nous avons montré que l'édelfosine provoquait une accumulation des cellules MCF-7 en phase G0/G1 pour des concentrations de 3 à 10  $\mu\text{M}$  (Thèse de Marie Potier).

L'équipe de Mollinedo et Gajate a beaucoup travaillé sur les mécanismes responsables de l'induction de l'apoptose par l'édelfosine dans les cellules cancéreuses, particulièrement dans les cellules leucémiques. Après avoir montré que l'effet de l'édelfosine était sélectif des cellules cancéreuses leucémiques (par rapport aux cellules saines) (Mollinedo, F. *et al.*, 1997), ils ont montré que l'une des voies utilisée par l'édelfosine pour provoquer l'apoptose est le recrutement et l'activation des récepteurs de la mort cellulaire, FAS/CD95, au niveau des radeaux lipidiques (raft) (Gajate, C. *et al.*, 2009). Ils démontrent que l'édelfosine réorganise les protéines au sein des rafts et recrute les éléments nécessaires à la formation des DISC (death-inducing signaling complex). En rapprochant les constituants de ce complexe (récepteur FAS/CD95, adaptateur FADD et l'effecteur caspase-8), l'édelfosine favorise l'engagement dans le processus d'apoptose.

Il a également été démontré que l'édelfosine pouvait s'incorporer dans les membranes du réticulum endoplasmique (Nieto-Miguel, T. *et al.*, 2007). Dans cette étude réalisée dans des cellules issues de tumeurs solides, l'édelfosine inhibe la synthèse de la PC et de protéines. Elle provoque également un relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le réticulum. Ces différents mécanismes induisent un stress de cet organe qui en réponse active différents facteurs de transcription et de voie de signalisation entraînant l'apoptose.

L'édelfosine réduit également l'angiogénèse et l'invasion des cellules tumorales. L'application de faibles concentrations (inférieures à 200 nM) d'édelfosine empêche la formation de tubules *in vitro* pour des cellules endothéliales humaines ou bovines (Candal, F. J. *et al.*, 1994; Vogler, W. R. *et al.*, 1998). Cette activité anti-angiogénique est confirmée *in vivo* sur un modèle de néovascularisation de la cornée. Les animaux recevant des injections d'édelfosine présentent l'incapacité de développer une néovascularisation contrairement aux animaux non traités (Vogler, W. R. *et al.*, 1998). Il a été montré que l'édelfosine diminuait la migration et l'invasion d'une matrice tridimensionnelle mimant la matrice extracellulaire de cellules invasives comme les cellules de gliomes (Bolscher, J. G. *et al.*, 1988; Engebraaten, O. *et al.*, 1991; Slaton, J. W. *et al.*, 1994; Haugland, H. K. *et al.*, 1999). Les mécanismes impliqués ne sont cependant pas précisés. Il a été supposé que l'édelfosine pouvait modifier la présentation de glycoprotéines à la surface cellulaire, ce qui diminuait l'invasivité cellulaire (Bolscher, J. G. *et al.*, 1988).

#### c) Autres activités de l'édelfosine

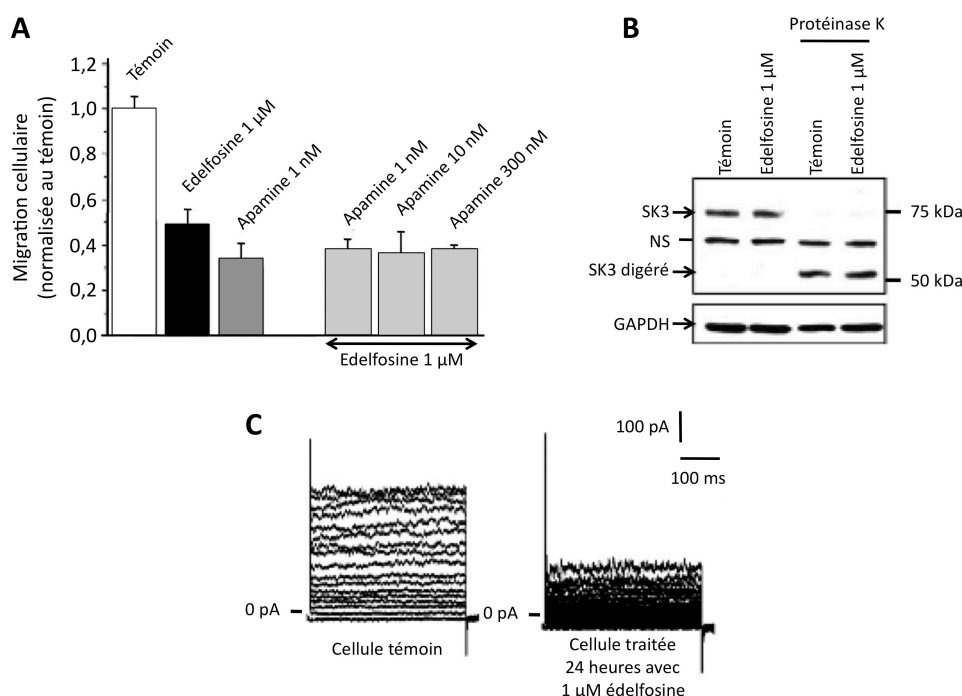
Il a été montré que l'édelfosine pouvait agir sur d'autres voies de signalisation cellulaires. La structure de l'édelfosine et celle du PAF étant très proches, il a été supposé que l'activité pro-apoptique de l'édelfosine pouvait passer par le récepteur du PAF. Sur différentes lignées cellulaires normales et leucémiques, l'édelfosine peut augmenter la concentration calcique intracellulaire en activant le récepteur du PAF (Alonso, M. T. *et al.*, 1997). Ce n'est pas cette voie qui induit l'apoptose car comme nous venons de le voir, il s'agit des voies impliquant le récepteur Fas ou le réticulum endoplasmique. L'application de PAF sur les cellules leucémiques sensibles à l'édelfosine n'entraîne pas l'apoptose et l'application d'antagoniste du PAF ne permet pas d'inhiber l'apoptose provoquée par l'édelfosine. L'affinité de l'édelfosine pour le récepteur du PAF est environ 5000 fois plus faible que pour son ligand spécifique.

L'édelfosine agit sur les protéines kinases C (PKCs) mais différentes études rapportent des résultats contradictoires. En utilisant des fractions membranaires issues de cellules leucémiques traitées ou non avec de l'édelfosine, les mesures d'activités des PKCs ont présenté des résultats opposés : augmentation de trois fois ou diminution de 30 % (Heesbeen, E. C. *et al.*, 1991; Berkovic, D. *et al.*, 1994). Des études plus récentes ont montré qu'en fonction de la forme sous laquelle l'édelfosine est administrée (monomère en solution ou intégrée dans la bicouche lipidique de liposomes) ainsi qu'en fonction de l'isoforme de PKC testée, les résultats pouvaient varier de façon opposée (Perkins, W. R. *et al.*, 1997; Conesa-

Zamora, P. *et al.*, 2005). Il n'existe donc pas encore de réponse précise sur l'activité de l'édelfosine envers les PKCs. Cela suggère que les différences présentées viennent surtout des isoformes de PKC testées (il s'agit en effet d'une famille constituée de 10 isozymes différenciées par le second messager nécessaire à leurs activations) et de l'ensemble des voies qui les régulent et varient d'un type cellulaire à l'autre. Les résultats concernant l'activité de cet éther-lipide sur cette famille d'enzymes sont donc à interpréter avec beaucoup de précautions.

L'édelfosine, comme les APL, s'incorpore dans les membranes cellulaires et modifie leurs propriétés ainsi que l'activité des protéines intégrées ou proches de la membrane. Il a été mis en évidence que l'édelfosine perturbe les transports ioniques au niveau membranaire. Il a été montré que l'édelfosine inhibait la pompe ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Zheng, B. *et al.*, 1990) et modulait l'activité de l'ATPase à  $\text{Ca}^{2+}$  des synapses cérébrales du rat (Grosman, N. 2001). Au laboratoire, une première étude a montré que l'édelfosine diminuait l'activité de l'échangeur sodium-proton (NHE) ce qui entraînait une diminution de la prolifération de cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (Besson, P. *et al.*, 1996).

Il a également été montré récemment que le canal SK3, médiateur de la migration des cellules MDA-MB-435s, était inhibé par l'édelfosine (Potier, M. *et al.*, 2011). L'édelfosine à 1  $\mu\text{M}$  inhibe la migration cellulaire des MDA-MB-435s d'environ 50 % (Figure 24).



**Figure 24. Activités de l'édelfosine sur les MDA-MB-435s.**

A. Effet inhibiteur de l'édelfosine sur la migration cellulaire des MDA-MB-435s. B. Expression protéique du canal SK3 en présence ou en absence d'édelfosine. (NS : Non-Spécifique, GAPDH : Glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase) C. Effets inhibiteurs de l'édelfosine sur les courants ioniques des cellules MDA-MB-435s. Modifié d'après Potier *et al.*, 2011, BJP.

En présence d'apamine, un inhibiteur spécifique des canaux SKCa, l'application d'édelfosine n'entraîne pas d'inhibition supplémentaire de la migration, ce qui suggère que l'effet de l'édelfosine passe par l'inhibition des canaux SKCa. Il a été montré précédemment que seul le canal SK3 était impliqué dans la migration des cellules MDA-MB-435s (Potier, M. *et al.*, 2006). Ces résultats ont été confirmés à l'aide de siRNA dirigés contre l'ARNm et l'expression de SK3. L'utilisation de ces siRNA entraîne une diminution de la migration des MDA-MB-435s et supprime totalement l'inhibition induite par l'édelfosine ce qui confirme que le canal SK3 est une cible de ce composé. Afin de déterminer le mode d'action de l'édelfosine, le niveau d'expression et l'adressage membranaire du canal SK3 ont été contrôlés sur des cellules traitées ou non avec l'édelfosine par Western Blot et par l'utilisation de la protéinase K. La protéinase K est une enzyme clivant des protéines membranaires sur leur domaine extracellulaire et permet ainsi de comparer le pool membranaire et le pool cytoplasmique (Syme, C. A. *et al.*, 2003). Un traitement de 24 heures avec 1  $\mu$ M d'édelfosine n'entraîne pas de diminution de l'expression de SK3 et n'affecte pas non plus son adressage à la membrane (Figure 24). L'activité du canal a ensuite été vérifiée par la technique de patch clamp. Dans les cellules MDA-MB-435s, l'application d'édelfosine (24 heures, 1  $\mu$ M) entraîne une diminution drastique des courants ioniques et dépolarise le potentiel de membrane des cellules (Figure 24). Il a été montré précédemment que les courants de ces cellules sont majoritairement portés par les canaux SK3 (Potier, M. *et al.*, 2006). En résumé, cette étude présente pour la première fois l'inhibition d'un canal ionique impliqué dans la migration cellulaire par l'édelfosine. Le mécanisme supposé est présenté dans la figure 36.

#### d) Utilisation de l'édelfosine en clinique

Différentes évaluations pré-cliniques de la toxicité et de l'efficacité de l'édelfosine ont été réalisées chez l'animal. Il a été démontré que le mode d'administration (injection intraveineuse, intra-péritonéale ou administration *per os*) et la préparation (monomère en solution dans le PBS ou couplé à des protéines du sérum) étaient importants. Les effets secondaires majeurs rapportés dans la littérature sont l'irritation gastro-intestinale par administration orale ou l'hémolyse pour les injections intraveineuses avec les doses les plus importantes. Il a été observé une toxicité faible pour des doses efficaces sur le développement de tumeurs primaires dans des modèles murin (Hardman, W. E. *et al.*, 1997)

Des essais de phase I et II ont donc été réalisés avec l'édelfosine. Dans l'essai de phase I réalisé entre 1979 et 1982, 16 patients atteints de tumeurs solides ou de leucémies ont été



traités avec l'édelfosine. Certains patients ont présenté quelques bénéfices (rémission sur quelques mois ou diminution des cellules cancéreuses circulantes) (Berdel, W. E. *et al.*, 1982; Berdel, W. E. *et al.*, 1982; Berdel, W. E. *et al.*, 1987). Des troubles gastro-intestinaux ont été observés pour des injections intraveineuses uniques à la dose de 50 mg/kg (Berdel, W. E. *et al.*, 1987). En administration quotidienne par injection intraveineuse, une dose de 20 mg/kg a entraîné des troubles pulmonaires et hépatiques (Berdel, W. E. *et al.*, 1987).

L'essai de phase II a été plutôt décevant. L'édelfosine apporté *per os* a été évalué pour des patients atteints d'un cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules à un stade avancé et non opérable (Drings, P. *et al.*, 1992). Seulement 2 patients ont présenté une rémission partielle sur la cohorte de 116 personnes incluses. Des effets secondaires (anorexie, nausées, vomissements, diarrhée) ont été observés lors de cet essai. Il était nécessaire d'augmenter la dose pour obtenir un effet bénéfique or cela provoquait une augmentation de l'incidence des effets délétères.

Afin de diminuer sa toxicité, l'édelfosine a été intégrée dans la bicouche lipidique de liposomes. Dans cette préparation, elle provoquait une hémolyse après injection intraveineuse à des concentrations vingt fois supérieures à l'édelfosine libre. Ce changement de formulation a également permis d'en augmenter l'efficacité sur des tumeurs *in vivo* (leucémie, mélanome B16/F10)(Ahmad, I. *et al.*, 1997).

L'édelfosine a également été utilisée pour purger la moelle osseuse des cellules cancéreuses avant une autogreffe. En effet, l'édelfosine entraîne l'apoptose sélectivement des cellules leucémiques mais n'affecte pas les cellules normales (Mollinedo, F. *et al.*, 1997). Le traitement des ces cellules par l'édelfosine suite au prélèvement de moelle osseuse et avant la réimplantation a permis un allongement du temps de rémission sans cellules leucémiques (Vogler, W. R. 1994; Vogler, W. R. *et al.*, 1996).

Dans l'ensemble des essais *in vivo*, l'activité de l'édelfosine a été testée sur l'évolution de la tumeur primaire. L'effet sur les métastases n'a jamais été évalué. Dans les modèles cellulaires, les activités anti-invasives ont été démontrées pour des concentrations inférieures aux concentrations cytotoxiques, il serait intéressant d'évaluer l'édelfosine *in vivo* sur un modèle de formations de métastase pour des concentrations plus faibles.

#### 4. Evolution des APL vers les phospholipides glycosylés

En raison de l'efficacité variable et de la persistance d'effets secondaires *in vivo*, certaines équipes se sont attachées à synthétiser de nouveaux composés dans le but d'améliorer les

effets anti-tumoraux et de diminuer la toxicité des APL. Ils se sont orientés vers des phospholipides glycosylés.

Les premiers composés qui ont été synthétisés sont la Glc-PC et le Glc-PAF dans lesquels un glucose a été inséré sur l'atome de carbone 2 d'une glycéro-phosphocholine ou du PAF respectivement (Mickeleit, M. *et al.*, 1995; Mickeleit, M. *et al.*, 1998). Ces composés ont des propriétés antiprolifératives sur la lignée HaCaT (lignée de kératinocytes pré-cancéreux) ainsi que sur des lignées tumorales. L'inositol-C2-PAF (Fischer, A. *et al.*, 2006) présente des propriétés anti-prolifératives supérieures à celles des composés précédents. Comme pour les ALP, les phospholipides glycosylés s'intègrent dans la membrane et modifient ses propriétés physiques.

Ces composés sont donc de nouveaux candidats pour être utilisés en thérapeutiques comme les APL en raison d'une efficacité *in vitro* équivalente mais présentant moins de toxicité.

## **Objectifs de la thèse**

Nous avons mis en évidence précédemment que le canal SK3 est un médiateur de la migration cellulaire de cellules cancéreuses mammaires et de mélanomes. Ce canal ionique pourrait devenir une cible potentielle dans le développement de nouvelles stratégies dirigées contre la progression tumorale. D'autre part, la modulation de cette protéine, et des fonctions qui en découlent, par l'édelfosine est un nouveau champ de recherche à explorer.

L'objectif de cette thèse est de comprendre quels sont les éléments structuraux de l'édelfosine nécessaires à l'inhibition du canal SK3 et de la migration cellulaire dépendante de ce canal. Par une étude de la relation entre la structure et l'activité d'analogues de l'édelfosine (en modifiant les différentes parties structurelles de cet éther-lipide), nous établirons la structure type d'un composé inhibiteur du canal SK3 de la famille des éther-lipides.

Par la suite, il serait intéressant d'évaluer le ou les analogues les plus efficaces vis-à-vis de la migration et du canal SK3 et présentant le moins de toxicité envers les cellules non cancéreuses. En utilisant des techniques de mesure de la viabilité cellulaire, de la migration ou des approches électrophysiologiques, nous nous attacherons à caractériser les mécanismes par lesquels ces composés inhibent le canal SK3 et tester les effets de ces molécules, *in vivo*, dans des modèles murins de cancer métastatique.

## **Méthodologie**

# I. La culture cellulaire

La culture cellulaire est réalisée en conditions stériles sous hotte à flux laminaire pour minimiser les risques de contaminations. De plus, la salle de culture est équipée d'un sas en surpression pour éviter l'introduction de poussières ou de contaminants dans cette pièce.

## A. Lignées cellulaires utilisées

### 1. Les cellules épithéliales mammaires cancéreuses et non cancéreuses

Les cellules MCF-10A (Soule, H. D. *et al.*, 1990) et les 184A1 (Milo, G. E. *et al.*, 1992) sont des cellules épithéliales transformées dites « normales » issues de mammoplasties. Ces cellules sont devenues spontanément immortelles par une culture à long terme dans un milieu sans sérum et présentant une faible concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  pour les MCF-10A et par exposition chimique au benzo(a)pyrène pour les cellules 184A1. Ces cellules ne provoquent pas l'apparition de tumeur lors de leur injection à des souris immunodéprimées.

La lignée de cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-435s (Cailleau, R. *et al.*, 1978) provient d'un épanchement pleural d'une patiente atteinte de cancer du sein.

### 2. Autres lignées cellulaires développées et utilisées

Dans le but de réaliser les expériences montrant l'implication du canal SK3 dans la motilité des cellules cancéreuses, la lignée MDA-MB-435s a été modifiée par la transduction d'un lentivirus exprimant des shRNA dirigés contre l'expression du transcrit et de la protéine. Ces lignées cellulaires ont été développées par le Dr Aurélie Chantôme en collaboration avec le Dr Virginie Joulin (Institut Gustave Roussy), le Pr J.C. Pagès, le Dr P. Vaudin et le Dr C. Collin (Laboratoire INSERM U966, Tours). Les cellules MDA-MB-435s ont subi deux infections successives. Elles ont d'abord reçu une première transduction par un rétrovirus codant pour la luciférase permettant le suivi *in vivo* des cellules lors de leur injection chez l'animal. La seconde transduction consiste en une infection par un lentivirus codant pour les shARNs de 2 types : un codant pour un ARN interférent « random », ne reconnaissant aucune

séquence connue shARN RD. Cette lignée appelée MDA-MB-435s shRD (SK3+) nous servira de contrôle. Le second shARN possède une séquence codant pour un ARN interférent avec l'ARN messager du canal SK3. Cette lignée appelée MDA-MB-435s shSK3 n'exprimera plus de manière stable la protéine SK3.

D'autre part, dans le but de tester les différents analogues d'éther-lipides sur les canaux de la famille SKCa et IKCa, la lignée HEK293 a été utilisée pour réaliser des lignées exprimant de manière stable les différents isoformes des canaux SKCa et IKCa. Les lignées HEK293 SK1, HEK293 SK2, HEK293 SK3 et HEK293 IKCa ont été développées par le Dr Aurélie Chantome.

Les différentes lignées cellulaires utilisées au cours de ce travail sont rassemblées dans le tableau 4.

Lignées cellulaires	Référence ATCC	Commentaires
MDA-MB-435s	HTB-129	Cellules épithéliales cancéreuses mammaires exprimant le canal SK3
MDA-MB-435s shRD		Cellules stables témoins et luciférase, cellules SK3+
MDA-MB-435s shSK3		Cellules stables luciférase qui n'expriment plus SK3, cellules SK3-
MCF-10A	CRL-10317	Cellules non cancéreuses
184A1	CRL-8798	Cellules non cancéreuses
HEK293T	CRL-11268	Lignée utilisée pour les transfections transitoires des canaux SKCa et IKCa
HEK293	CRL-1573	Lignée utilisée pour les clones stables exprimant les canaux SKCa et IKCa
HEK293-SK1		Cellules exprimant de manière stable le canal SK1 (HEK-SK1)
HEK293-SK2		Cellules exprimant de manière stable le canal SK2 établies et en cours de validation (HEK-SK2), les expériences ont été réalisées sur des cellules en transfections transitoires
HEK293-IKCa		Cellules exprimant de manière stable canal IKCa (HEK-IKCa)
HEK293-SK3		Cellules exprimant de manière stable canal SK3 (HEK-SK3)

**Tableau 4. Lignées cellulaires utilisées.**

Pour établir la lignée HEK293 qui exprime le canal SK3, nous avons réalisé une transduction avec un lentivirus contenant l'ADNc complet du SK3 de rat. La préparation lentivirale a été réalisée en collaboration avec Pr. J.C. Pagès, Dr P. Vaudin et Dr C. Collin de l'équipe

INSERM U966 (Tours) à partir du plasmide donné par le Dr Lidofsky. La majorité des expériences de patch-clamp réalisées sur le canal SK3 ont utilisé cette lignée stable.

Concernant le canal SK2, les cellules exprimant ce canal de manière stable viennent d'être établies et sont en cours de validation. Nous n'avions pas à notre disposition de plasmide correct permettant la création de cette lignée. Nous avons obtenu récemment un plasmide codant pour le canal rSK2 auprès du Dr Marrion (Université de Bristol, UK). Les cellules HEK-SK2 utilisées dans les expériences sont des cellules transfectées transitoirement avec le plasmide du Dr Skolnik qui contient la séquence d'un canal SK2 présentant une pharmacologie particulière. Il est insensible à l'apamine. Nous avons donc utilisé le TEA pour inhiber le courant SK2.

Les lignées HEK-SK1 et HEK-IKCa ont été transfectées de manière stable avec les plasmides présentés page 129. Un jour après la transfection (décrite page 129), les cellules ont été mises en présence d'antibiotique de sélection (G418) afin de sélectionner les cellules résistantes qui expriment le canal d'intérêt. La concentration de l'antibiotique est réduite progressivement puis les cellules sont entretenues en absence d'antibiotique. Les cellules sont contrôlées en cytométrie en flux pour vérifier l'expression du canal (le plasmide SK1 coexprime la GFP et le canal IKCa présente un épitope HA qui permet son marquage par un anticorps fluorescent).

### 3. Limites des cultures cellulaires

Toutes ces lignées cellulaires (MDA-MD-435s, MCF-10A, 184A1) possèdent un panel de récepteurs cytoplasmiques et membranaires différents et ne présentent pas les mêmes capacités de migration, d'invasion et de prolifération.

L'avantage principal de la culture cellulaire est de pouvoir profiter à tout moment d'un modèle d'étude pour l'identification de molécules, de cibles ou de mécanismes physiologiques. L'entretien des cellules est facile, nous pouvons disposer chaque jour de cellules et la densité cellulaire est parfaitement contrôlée.

Cependant, l'observation *in vitro* d'un mécanisme n'est pas le reflet exact de ce qui se passe à l'intérieur d'une tumeur. L'utilisation d'une culture cellulaire est l'utilisation d'un outil « simplifié » dans des conditions standardisées en comparaison de la tumeur qui présente des cellules très hétérogènes et un environnement riche en facteurs de croissance et chimioattractants divers. Au sein de cette structure, les cellules sont en contact étroit avec le stroma, la matrice extra cellulaire et le système sanguin. De plus, les conditions de culture *in vitro* sont très différentes de celles observées *in vivo*. Les milieux de culture utilisés



contiennent entre 2,7 et 4,5 g.L<sup>-1</sup> de glucose ce qui représente une hyperglycémie permanente. La composition en nutriments est également sûrement plus riche que ce qui peut atteindre les cellules au sein d'une tumeur. De même, l'apport en oxygène est différent entre une culture cellulaire et l'intérieur d'une tumeur : lors de la culture cellulaire, le taux d'oxygène apporté et dissout est bien supérieur à celui d'une tumeur qui se trouve généralement en condition hypoxique. Une autre différence concerne également le pH qui est tamponné dans nos milieux de culture par un tampon bicarbonate aux environs de 7,4 alors qu'il a souvent été montré que l'environnement cellulaire d'une tumeur était acide. Enfin, il est important de noter que dans nos conditions de culture cellulaire, les cellules prolifèrent et se développent dans un système en deux dimensions ce qui n'est pas le cas dans une tumeur laquelle se développe dans un environnement en trois dimensions.

Il est donc important de toujours considérer ce modèle de culture cellulaire *in vitro* comme un outil nécessaire à la compréhension des mécanismes avant le passage à des modèles plus complexes. La confirmation devra être réalisée par des approches *in vivo* ou cliniques si possible.

#### 4. Solutions et plastiques utilisés en culture cellulaire

##### a) Solutions

Les lignées cancéreuses mammaires sont cultivées en milieu Dubelcco's Modified Eagle's Medium DMEM (Lonza, USA), contenant l'ensemble des acides aminés de la série L indispensables, des vitamines, 4,5 g/L de D-Glucose, 584 mg/L de glutamine et 3,7 g/L de NaHCO<sub>3</sub>. Ce milieu est supplémenté avec 5 % de sérum de veau fœtal pour les lignées cancéreuses mammaires.

Les cellules non cancéreuses épithéliales mammaires sont cultivées en milieu Ham's F12 supplémenté avec 5 % de sérum de cheval, 10 µg/mL d'insuline, 20 ng/mL d'EGF, 0,5 µg/mL d'hydrocortisone, complété avec 100 ng/mL de toxine cholérique pour les MCF-10A et 1 ng/mL de toxine cholérique + 5 µg/mL de transferrine pour les 184A1 en accord avec les recommandations de l'ATCC.

La couleur du milieu DMEM sera un indicateur du pH. En effet, au pH physiologique (pH = 7,4), le milieu est de couleur rouge et devient jaune ou violacé respectivement suite à une acidose ou à une alcalose. Le pH est contrôlé par le tampon bicarbonate créé par la dissolution

du CO<sub>2</sub> atmosphérique et apporté dans le milieu de culture :  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$

La solution de D-PBS (Lonza, USA) ne contient ni Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> et permet de « laver » les cellules de leur milieu de culture. La suppression du Ca<sup>2+</sup> dans l'environnement cellulaire va fragiliser les liaisons des cellules entre elles et au support ce qui facilitera leur décollement. Le pH de cette solution se situe entre 7,2 et 7,4 et son osmolarité est comprise entre 257 et 302 mOsm/kg. Sa composition est la suivante (mg/L) : KCl 200, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200, NaCl 8000, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2160, Glucose 1000, Sodium Pyruvate 36.

La solution de Trypsine-EDTA 1:250 (Lonza, USA) permet de mettre en suspension les cellules adhérentes par protéolyse des protéines d'adhésion intercellulaire et d'adhésion au support. Elle ne contient ni Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>. La solution contient également un chélateur de Ca<sup>2+</sup> et de Mg<sup>2+</sup>, l'EDTA, qui permet de fragiliser les liaisons dépendantes du Ca<sup>2+</sup> entre les cellules ou les liens au support. L'activité de cette enzyme est maximum à 37°C et l'arrêt de la réaction sera provoqué par l'ajout de milieu contenant du SVF qui saturera l'enzyme.

#### b) Supports utilisés en culture cellulaire

Les cellules sontensemencées dans des flacons de culture de 25, 75 et 175 cm<sup>2</sup> stériles et traités physiquement ce qui permet l'adhésion des cellules. Ces flacons sont fermés par un bouchon poreux permettant les échanges gazeux mais protégeant le milieu interne de toute contamination.

La culture cellulaire des cellules HEK-SK3 a nécessité l'utilisation de flacons de culture ayant subi un traitement spécial et chargé positivement (flacon PureCoat Amine Réf. 354726, BD, France) afin d'augmenter leur adhésion et de faciliter les conditions de cultures.

Pour les expériences de transfection et les tests de toxicité, nous avons utilisé des plaques 6 ou 24 puits (Réf. 353934 et 353935, BD, France). La préparation des cellules pour le patch clamp est réalisée dans des boîtes de 35 mm de diamètre (Corning, Réf. 430165).

## B. Protocoles de culture cellulaire

### 1. Décryogénisation et cryogénisation des cellules

La décongélation doit être rapide et se fait au bain marie à environ 37°C. Une fois décongelée, la suspension cellulaire est entièrement transférée dans un flacon contenant du milieu pré conditionné (pH et température). Le milieu sera obligatoirement changé le lendemain afin d'éliminer le DMSO contenu dans le milieu de cryogénisation.

Pour la congélation, les cellules sont mises en suspension puis reprises dans du milieu (DMEM, 5 % SVF) pour le dénombrement. La suspension cellulaire est centrifugée à 700xg pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est repris dans le milieu de cryoconservation constitué de 10 % de DMSO, 30 % de SVF et 60 % de milieu de culture DMEM pour les cellules épithéliales. Le milieu de conservation des cellules HEK293 est composé de 10 % de DMSO et 90 % de SVF. La suspension est aliquotée à raison de 1,5 millions de cellules par cryotubes puis congelée lentement à -80°C avant d'être placée dans l'azote liquide à -196°C.

### 2. Trypsination des cellules

Les lignées cellulaires utilisées sont adhérentes. Pour dissocier les cellules du support ou bien les séparer les unes des autres, nous utilisons une solution enzymatique : la trypsine-EDTA. L'EDTA permet de rompre les liaisons dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  et du  $\text{Mg}^{2+}$  des cellules au support. La trypsine est une endoprotéase qui va cliver les adhérences cellules-cellules et les adhérences cellules-support. L'activité maximale de cette enzyme est obtenue à 37°C et la réaction enzymatique est bloquée par saturation avec le SVF. Il est donc nécessaire avant de trypsiner les cellules d'effectuer deux rinçages à l'aide du D-PBS sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  pour supprimer le SVF du milieu de culture. Les cellules sont alors reprises dans du milieu supplémenté en SVF ce qui stoppe l'action de l'enzyme par un phénomène de saturation.

### 3. Evaluation de la toxicité et prolifération cellulaire

Pour déterminer les propriétés toxiques d'un composé ou pour évaluer les propriétés de prolifération des cellules, nous utilisons le test MTT (Mosmann, T. 1983). Il s'agit d'un test colorimétrique basé sur la réduction du 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide ou MTT en cristaux de formazan par la succinate déshydrogénase. Cette réaction est possible uniquement dans les cellules vivantes. Après solubilisation des cristaux dans le

DMSO, l'intensité de la coloration ou densité optique (DO) est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 570 nm. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle au nombre de cellules viables.

Ce test présente certaines limites car :

- il est difficilement adaptable à des lignées possédant une faible activité mitochondriale,
- certains composés entraînent une modification de l'activité mitochondriale provoquant un biais dans la lecture du résultat,
- les activités enzymatiques sont variables entre les différentes lignées, nous pouvons donc difficilement les comparer entre elles.

#### a) Protocole du test MTT

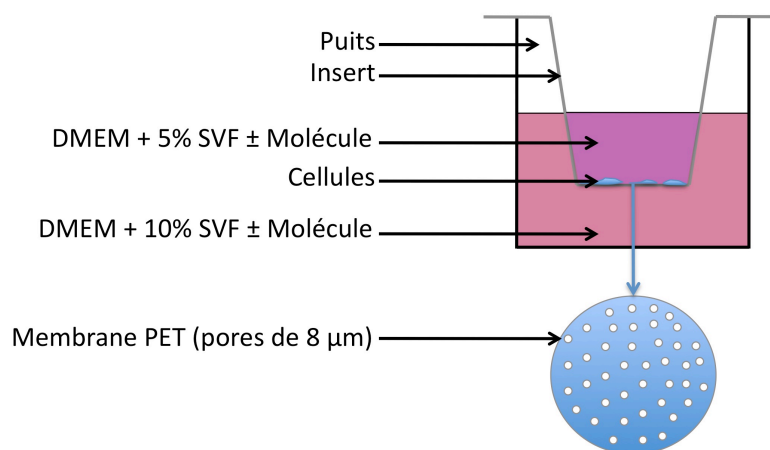
Pour réaliser ce test, nous implantons les cellules dans une plaque 24 puits à la densité de 40000 cellules par puits. L'évaluation de la toxicité se fait sur 24 heures en présence ou non du composé à évaluer. La prolifération est mesurée sur une période de cinq jours en présence de la molécule testée.

A la fin de la période de test, le milieu est retiré puis remplacé par 400  $\mu$ L d'une solution contenant 0,5 g/L de MTT et incubé à 37°C. En fonction de la lignée utilisée, le temps d'incubation est variable : 45 minutes pour les MDA-MB-435s, 50 minutes pour les MCF-7, 60 minutes pour les HEK293 et 90 minutes pour les MCF-10A et les 184A1.

Après incubation, la solution de MTT est retirée et les cristaux de formazan sont solubilisés dans 400  $\mu$ L de DMSO sous agitation. La DO est mesurée à 570 nm et normalisée à la condition contrôle.

### 4. Evaluation de la motilité cellulaire

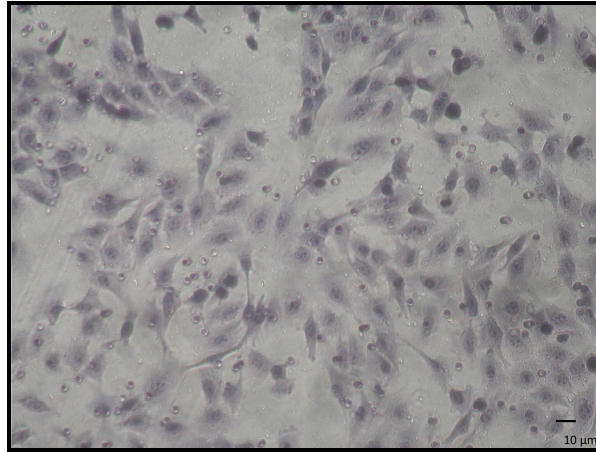
L'évaluation de la motilité cellulaire est réalisée par le comptage des cellules ayant migré au travers du filtre poreux d'un insert (équivalent des chambres de Boyden). Le système utilisé lors de nos expérimentations est présenté dans la figure 25.



**Figure 25. Système d'évaluation de la migration.**

Les inserts (Réf. 353097, BD, France) sont placés dans une plaque 24 puits. Dans le compartiment supérieur, nous déposons 200  $\mu$ L d'une suspension cellulaire à la densité de 200 000 cellules / mL en présence ou non de la substance à tester dans du DMEM supplémenté à 5 % de SVF. Dans le compartiment inférieur, nous déposons 800  $\mu$ L de DMEM supplémenté avec 10 % de SVF  $\pm$  la substance à tester. Ce milieu plus riche en éléments nutritifs et attractifs (hormones et facteurs de croissance) servira à créer un gradient chimioattractant permettant d'orienter la migration des cellules. Les inserts utilisés possèdent une membrane en polyéthylénétéréphtalate (PET) avec des pores de 8  $\mu$ m. Cette taille est inférieure à celle de nos cellules, ce qui implique que la migration des cellules entraîne une déformation de celles-ci afin de passer au travers du filtre. Il s'agit donc d'un mécanisme actif et non d'une diffusion liée à la gravité.

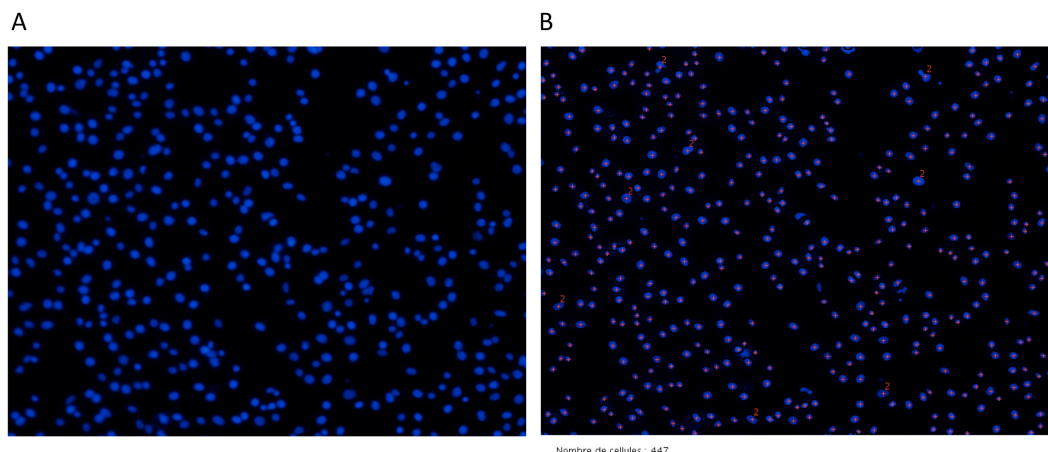
Après 24 heures d'incubation, les inserts sont rincés dans du D-PBS puis fixés pendant 10 minutes dans du méthanol glacé. Les cellules restées sur la face supérieure sont alors éliminées à l'aide d'un coton tige. Afin de dénombrer les cellules ayant migré, nous avons utilisé 2 protocoles de coloration : (i) coloration à l'hématoxyline (Figure 26). Le comptage se fait sur cinq champs de l'insert au grossissement 200x à l'aide du logiciel Mesurim (logiciel gratuit développé par J-F. Madre, Amiens). (ii) coloration au DAPI. Il s'agit d'un agent intercalant fluorescent qui émet une lumière bleue intense suite à l'exposition à une lumière UV.



**Figure 26. MDA-MB-435s sur la face inférieure de l'insert colorées à l'hématoxyline suite à une expérience de migration.**

En collaboration avec Thierry Brouard (MCU, Université François Rabelais-Tours, Laboratoire d'informatique) et le Dr Aurélie Chantôme, nous avons développé un logiciel de comptage automatique basé sur le comptage des noyaux dans les images obtenues par épifluorescence (Brouard, T. *et al.*, 2009). Ce logiciel permet une évaluation précise et rapide du nombre de cellules. En utilisant ce second protocole, nous réalisons une série de 9 photos par insert (Figure 27).

Quelle que soit la méthode de coloration et de comptage, les résultats représentent la moyenne du nombre de cellules par champ. Les données obtenues pour chaque condition sont normalisées au contrôle et sont représentées sous la forme de moyenne plus ou moins l'erreur standard à la moyenne.



**Figure 27. MDA-MB-435s colorées au DAPI après migration puis dénombrées par le logiciel.**

A) MDA-MB-435s colorées au DAPI sur la face inférieure de l'insert. (Photo réalisée au grossissement 200x) B) Image obtenue à la sortie du traitement par le logiciel. Les croix rouges correspondent à 1 une cellule et les numéros indiquent que le logiciel a dénombré x cellules pour la surface colorée. L'image de sortie comporte également le résultat final avec le nombre de cellules déterminées.

## 5. Expériences de déplacements de ligands spécifiques et d'activation du récepteur au PAF

Afin de déterminer la capacité de l'Ohmlin (JPH1701) ou de l'édelfosine à se fixer sur les récepteurs et les canaux, des expériences de déplacements de ligands et d'activation du récepteur au PAF ont été réalisées par la CEREP (Celle L'Evescault, France). Les préparations membranaires contenant le canal ou le récepteur d'intérêt sont incubées avec leurs ligands spécifiques en présence ou non d'Ohmlin et d'édelfosine pendant 60 ou 120 minutes en fonction de la cible. Après l'incubation, les échantillons sont filtrés sous vide sur des filtres en fibre de verre (GF/B, Packard) préhumidifiés avec une solution de polyéthylèneimine à 0,3 % et rincés plusieurs fois avec une solution Tris-HCl (50 mM) glacée en utilisant un préparateur d'échantillons 96 puits (Unifilter, Packard). Les filtres sont séchés puis la radioactivité est enregistrée à l'aide d'un compteur à scintillation (Topcount, Packard) en utilisant un cocktail de scintillation (Microscint 0, Packard). La fixation non spécifique est déterminée en présence du composé de référence. Les composés de référence standards pour les tests suivants : récepteur LPA, récepteur PAF, canal calcique (type L site à la dihydropyridine), canal hERG, canaux SKCa et canal sodique (site 2) sont respectivement [ $^3\text{H}$ ]LPA, [ $^3\text{H}$ ]C16-PAF, [ $^3\text{H}$ ]nitrendipine, [ $^3\text{H}$ ]astemizole, [ $^{125}\text{I}$ ]apamine et [ $^3\text{H}$ ]batrachotoxine. Ces molécules sont testées dans chaque expérience à plusieurs concentrations pour obtenir une courbe dose-réponse dont l' $\text{IC}_{50}$  est calculé. Les résultats sont exprimés en pourcentages de la fixation du ligand spécifique ((Fixation ligand mesurée/Fixation ligand en condition contrôle) x 100) obtenue en présence d'Ohmlin (JPH1701) ou d'édelfosine. La fixation non spécifique est déterminée en présence du composé de référence de la même manière que les éther-lipides sont évalués sauf pour les tests du récepteur au PAF qui utilise le WEB2086, du canal calcique qui utilise la nifedipine et du canal sodique qui utilise la veratridine.

Pour évaluer l'activation du récepteur au PAF, des cellules CHO exprimant le récepteur sont incubées en présence d'Ohmlin ou d'édelfosine à 22°C et la concentration calcique intracellulaire est mesurée par fluorimétrie. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la réponse à l'agoniste spécifique ((réponse spécifique mesurée/ réponse de l'agoniste spécifique en condition contrôle) x 100) qui est le PAF à 100 nM.

## 6. Mesures d'activités de la phospholipase C (PLC) et des protéines kinases C (PKCs)

Ces expériences ont été réalisées par la CEREP. La phospholipase C (PLC) est produite dans *Bacillus cereus* et les protéines kinases C (PKCs) sont produites dans des cellules d'insectes. Les enzymes sont incubées en présence ou non d'Ohmline (JPH1701) pendant 10 à 60 minutes en fonction du test. Le substrat utilisé pour la PLC est la glycerophosphoéthanolamine et le produit est le diacylglycérol. Dans les tests des PKCs, deux substrats sont utilisés en présence d'ATP : biotiny- $\beta$ ABA $\beta$ AKIQASFRGHMARKK pour les PKC $\alpha$ , PKC $\gamma$ , PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\zeta$ , PKC $\eta$ , PKC $\theta$  et PKC $\iota$  et CREBtide (CKRREILSRPSYRK) pour PKC $\beta$ 1 et PKC $\beta$ 2. Quel que soit le test, les produits sont mesurés par fluorescence (fluorimétrie pour la PLC, HTRF ou LANCE pour les PKC). Pour les tests de la PLC, le composé de référence est le D609 et pour toutes les PKCs, excepté la PKC $\beta$ 2 qui utilise la staurosporine, le composé de référence est le Bis 10. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité spécifique contrôle ((activité spécifique mesurée/activité en condition contrôle) x 100) obtenue en présence d'Ohmline.

## 7. Détermination du profil génotoxique

Ce test est composé de trois expériences afin d'évaluer les propriétés de l'Ohmline (CEREP). La cytotoxicité bactérienne est évaluée sur 3 souches (TA98, TA100 et TA1535) avec 8 concentrations d'Ohmline de  $6,3 \cdot 10^{-7}$  M jusqu'à  $1 \cdot 10^{-4}$  M. Le composé de référence est la mytomycine C. Un test de Ames est également réalisé sur les trois mêmes souches de bactéries en présence ou non de sérum S9. L'Ohmline est testée de  $5 \cdot 10^{-6}$  M à  $1 \cdot 10^{-4}$  M. Dans ce test, les composés de référence sont l'aminanthracène, la mitomycine C, la quercétine et la streptozotocine qui possèdent différentes propriétés mutagènes en fonction de la souche et des conditions (avec ou sans sérum S9). Pour ces deux premiers tests, la mesure est réalisée par photométrie. Le test des micronoyaux dans les cellules CHO-K1 en présence ou non de sérum S9 est le dernier test. Les produits sont évalués aux mêmes concentrations que le test de Ames. Le produit de référence est la mytomycine en absence de sérum S9 et la cyclophosphamide avec le sérum. Les résultats pour le test des micronoyaux sont obtenus par imagerie de fluorescence. Les résultats pour la cytotoxicité bactérienne sont exprimés en pourcentage de la croissance contrôle (DO 650 nm). Les composés qui entraînent une croissance inférieure à 60 % sont considérés cytotoxiques. L'analyse pour le test de Ames est la suivante : les puits présentant une croissance bactérienne due à la réversion de la mutation



pour l'histidine sont comptés et enregistrés comme positifs. La significativité des comptes positifs entre le traitement (en présence d'Ohmline) et la condition contrôle (en absence de composé testé) est calculée en utilisant le test exact de Fischer. Pour le test des micronoyaux, le nombre de cellules présentant des micronoyaux est compté. Un résultat faiblement positif est défini par une valeur significativement supérieure au témoin et au moins deux fois plus élevée que le témoin. Un résultat positif est défini par une valeur significativement plus élevée que le témoin et au moins trois fois supérieure au témoin.

## II. Biologie moléculaire

### A. Transfection transitoire

Dans le but d'étudier l'activité des différents éther-lipides sur les canaux d'intérêts, nous avons réalisé un ensemble de transfections transitoires des canaux SK1, SK2, SK3 et IKCa dans le système d'expression cellulaire HEK293T avant d'utiliser les lignées stables. Les plasmides que nous avons utilisés sont les suivants :

- plasmide pXOOM-hSK1 (Dr Peitersen, University of Copenhagen, Danemark)
- plasmide JPAS rSK2 (Dr Skolnik, New York University Langone Medical Center, USA)
- plasmide SK3-pTracer-CMV2 (Dr Lidofsky, Oregon Health Sciences University, USA))
- plasmide pCDNA3.1-HA-SK4 (IKCa) (Dr Devor, University of Pittsburgh, USA))

#### 1. Préparation des plasmides

La première étape consiste à réaliser la transformation bactérienne. Il s'agit d'introduire le plasmide dans des bactéries compétentes pour l'amplification du plasmide. Le protocole utilisé pour réaliser cette étape est le suivant :

- Les bactéries compétentes DH5 $\alpha$  (Invitrogen, réf. 18263-012) sont décongelées dans de la glace fondante.
- La quantité nécessaire de bactéries (50 ou 100  $\mu$ L) pour chaque condition est distribuée dans une série de tubes préparés dans la glace fondante puis incubée 30 min en présence de la quantité de plasmide nécessaire
- Un choc thermique de 45 secondes est réalisé dans le bain marie thermostaté à 42°C puis les cellules sont remises dans la glace pendant 2 minutes
- 450 ou 900  $\mu$ L de milieu S.O.C. (Super Optimal broth with Catabolite repression medium, milieu de culture bactérien enrichi en nutriment) à 37°C sont ajoutés dans chacun des tubes qui sont alors placés sous agitation pendant une heure à 37°C et 225 rotations par minutes

- Différentes solutions de bactéries diluées sont déposées sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose avec l'antibiotique de sélection et sont incubées toute une nuit.

A partir de cette étape, il est alors nécessaire d'amplifier les bactéries ayant été transformées pour obtenir une quantité utilisable d'ADN plasmidique. Nous sélectionnons alors 3 ou 4 colonies sur les boîtes de géloses et nous les amplifions pendant 24 heures dans du milieu LB (Lysogeny broth) contenant toujours l'antibiotique de sélection.

## 2. Purification de l'ADN plasmidique

Cette étape de préparation est réalisée à l'aide du kit Plasmid DNA purification Nucleobond Xtra Midi Plus (Macherey-Nagel, Allemagne). Il est nécessaire d'obtenir une densité cellulaire suffisante pour purifier l'ADN (correspondance  $DO=0,4$  après une dilution au  $1/10^{\text{ème}}$ ). Les bactéries sont alors centrifugées, resuspendues dans un tampon adéquat puis lysées pendant 5 minutes à température ambiante. L'étape suivante consiste à neutraliser la lyse puis à charger la colonne échangeuse d'ion. L'ADN retenu par la colonne sera élué à l'aide d'un tampon préalablement chauffé à  $50^{\circ}\text{C}$  puis concentré à l'aide du Nucleobond finalizer inclus dans le kit. La qualité et la quantité d'ADN purifié seront contrôlées par spectrophotométrie UV. Une mesure à 260 nm nous permet de déterminer la quantité d'ADN et une mesure à 280 nm nous permet de vérifier sa pureté. Le rapport  $R=A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  doit être compris entre 1,8 et 2 pour avoir un échantillon de bonne qualité non contaminé par des protéines.

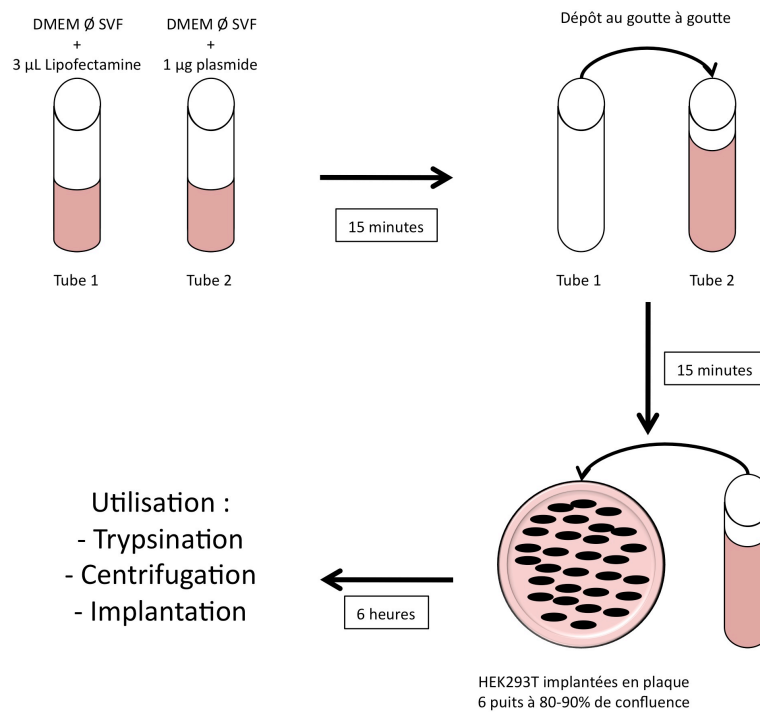
A la fin de cette étape, nous réalisons une PCR sur le plasmide obtenu afin de vérifier qu'il contient le gène codant pour le canal d'intérêt.

## 3. Transfection transitoire

L'incorporation du plasmide dans les cellules se fait grâce à l'utilisation de Lipofectamine 2000 (Réf. 11668-019, Invitrogen, France) qui permet de capter l'ADN plasmidique, neutraliser ses charges négatives et le faire pénétrer dans la cellule.

Nous utilisons le protocole représenté dans la figure 28. Il consiste à préparer 2 tubes contenant  $100\text{ }\mu\text{L}$  de DMEM sans SVF chaud et  $3\text{ }\mu\text{L}$  de lipofectamine pour le premier tube ou  $1\text{ }\mu\text{g}$  de plasmide pour le second tube. Nous attendons 15 minutes puis nous transférons au goutte à goutte le contenu du premier tube dans le second. Une seconde période d'incubation de 15 minutes est réalisée. Enfin nous déposons la solution de plasmide et de lipofectamine

sur le puits contenant les cellules HEK293T à environ 80-90 % de confluence. Les cellules sont laissées en présence du plasmide pendant au moins 6 heures puis elles sont trypsinées, centrifugées et réimplantées selon le protocole souhaité.



**Figure 28. Protocole de transfection transitoire.**

### III. Electrophysiologie cellulaire

#### 1. Introduction

La technique de patch clamp a été décrite par Erwin Neher et Bert Sakmann en 1976 (Prix Nobel en 1991) lors de l'étude de fibres musculaires dénervées de grenouille (Neher, E. *et al.*, 1976). Cette méthode permet d'enregistrer les courants ioniques macro- ou microscopiques de cellule unique en réponse à un stimuli chimique ou physique. Deux cas sont possibles pour l'utilisation de cette technique : appliquer un voltage et enregistrer les courants, on parle de « voltage clamp » (voltage imposé) ou à l'inverse, observer les effets sur le voltage membranaire de l'application d'un composé en imposant un courant, il s'agit de la configuration de « current clamp » (courant imposé).

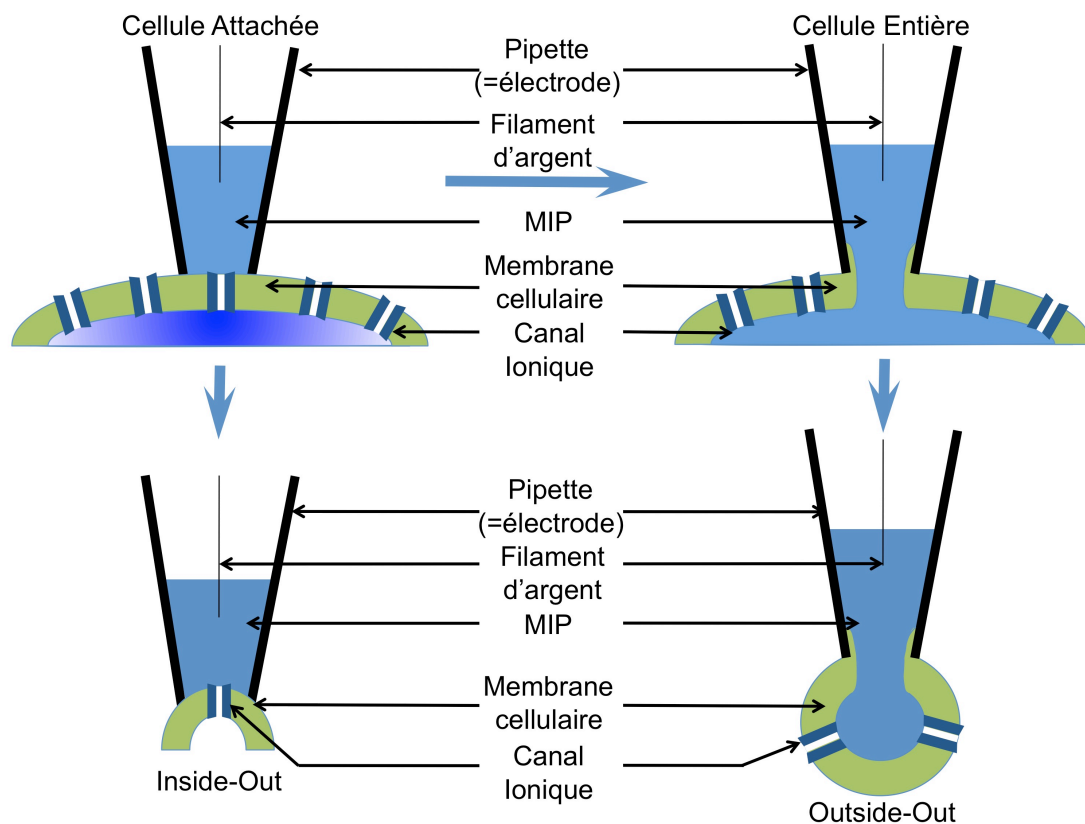
Le principe de la technique est d'approcher une micropipette en verre, dont le diamètre à la pointe est de l'ordre du micromètre, d'une cellule. Lors du contact de la pipette avec la cellule, une résistance importante va se créer, ceci étant lié aux propriétés d'adhérence et d'interaction du verre avec la bicouche lipidique. Le contact ainsi formé sera appelé « Seal » et le morceau de membrane isolé sous la pointe de la pipette sera désigné par le terme « Patch ». La qualité de ce scellement électrique sera contrôlée par la valeur de la résistance qui doit être supérieure à 1 G $\Omega$ , nous parlons alors de « Gigaseal ». La micropipette contient un milieu intra-pipette (MIP) de composition connue et sert de microélectrode pour contrôler le potentiel de membrane et enregistrer les courants. Les évolutions de la technique et les différentes possibilités d'enregistrement ont été rapportées par Hamill en 1981 (Hamill, O. P. *et al.*, 1981).

#### 2. Les différentes configurations

La description initiale de la technique de patch clamp par Hamill et ses collaborateurs comportait 4 configurations utilisables pour l'enregistrement des courants ioniques et sont représentées dans la figure 29.

La première situation envisageable pour l'enregistrement est la configuration de cellule attachée ou « cell-attached ». A l'obtention du gigaseal, il est possible d'enregistrer les

courants microscopiques dus à l'activité des canaux présents sur le morceau de membrane isolé par la pipette.



**Figure 29. Schéma des quatre configurations utilisables en patch clamp.**

A partir de cette première configuration, il est possible de rompre le morceau de membrane isolé précédemment sous la pipette en appliquant une pression négative brève avec un retour à la pression normale rapide. La rupture du patch peut également être réalisée par l'application d'un choc électrique de haut voltage et bref, appelé « zap », qui déstabilise les phospholipides de la membrane. Cette configuration est intitulée patch rompu (« ruptured patch ») ou cellule entière (« whole cell »). Dans ce cas, le milieu intracellulaire est dialysé par le MIP de composition connue ce qui nous permet de contrôler parfaitement le milieu intracellulaire. Avec cette configuration, nous avons un accès électrique direct à l'intérieur de la cellule ce qui nous permet d'enregistrer les courants macroscopiques générés par l'ensemble des canaux ioniques présents à la membrane. Il est important de noter que cette configuration peut entraîner la perte d'éléments intracellulaires (second messenger ou protéine par exemple) nécessaires au fonctionnement des canaux. Afin d'éviter la perte de ces médiateurs, Richard Horn et ses collaborateurs ont mis au point la technique de patch perforé (Horn, R. *et al.*, 1988). Il s'agit d'ajouter au MIP des antibiotiques tels que la nystatine ou l'amphotéricine B.

Ces molécules très hydrophobes vont venir s'insérer dans la membrane lipidique et créer des canaux spécifiques aux ions monovalents ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et dans une moindre mesure au  $\text{Cl}^-$ ). Il y aura alors une parfaite conduction électrique entre la pipette et le milieu intracellulaire sans perte d'éléments régulateurs.

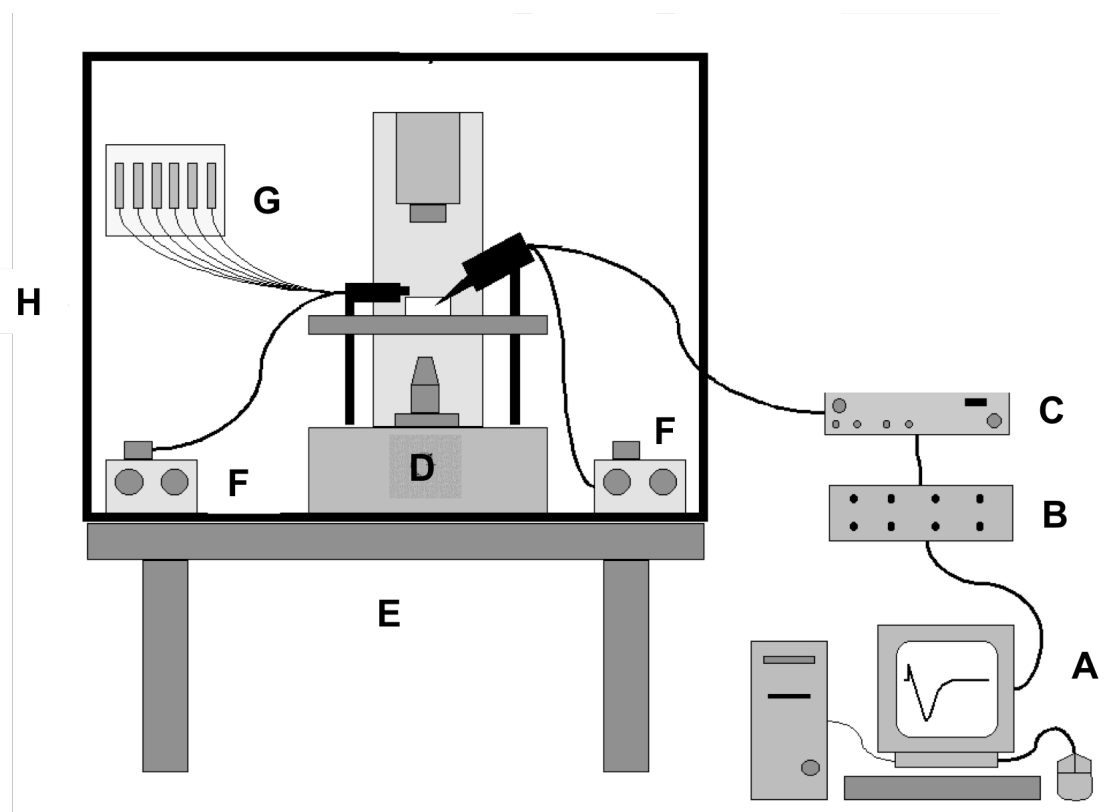
Les deux dernières configurations sont les configurations dites de patch excisé, Inside-out et Outside-out. Elles permettent d'enregistrer les courants microscopiques d'un ou de quelques canaux isolés au niveau du bout de membrane. Dans les deux cas, il s'agit d'arracher le morceau de membrane isolé sous la pipette. Pour obtenir la configuration Inside-out, il faut retirer rapidement la pipette de la configuration cellule attachée et la face interne de la membrane sera exposée au milieu remplissant la boîte de Pétri. Pour atteindre la configuration Outside-out, il faut retirer délicatement la pipette de la configuration cellule entière. Ceci provoquera la « déchirure » de la membrane de part et d'autre du patch et ces morceaux reformeront une vésicule. Dans ce cas, la face en contact avec le bain sera la face externe.

### 3. L'installation de patch-clamp

Le dispositif expérimental est placé sur une table à coussin d'air permettant d'isoler l'installation des vibrations extérieures et isoler de l'environnement électrique par un confinement dans une cage de Faraday reliée à la terre (Figure 30). La boîte de Pétri contenant les cellules nécessaires aux expérimentations est placée sur un microscope inversé. La micropipette est approchée de la cellule d'intérêt à l'aide d'un micromanipulateur piézoélectrique. La tête de perfusion est approchée à l'aide d'un micromanipulateur hydraulique. Ce système est relié à 9 capillaires dont l'ouverture est contrôlée mécaniquement par un système d'électrovannes.

La pipette de patch sert d'électrode de mesure et d'électrode d'imposition du voltage ou du courant. Elle est remplie de MIP et est reliée à la tête de l'amplificateur qui sert d'adaptateur d'impédance. Un fil d'argent chloruré baigne dans le MIP et permet la liaison électrique de l'électrode à l'amplificateur. Pour fermer le système électrique, l'électrode de référence est plongée dans le bain environnant les cellules. Ces deux électrodes sont reliées à un amplificateur de patch clamp qui réalise la conversion courant-tension avant de réaliser l'amplification du signal. Cet amplificateur est relié à une carte de conversion analogique/numérique-numérique/analogique permettant la conversion du signal physique, la tension, en un signal numérique analysable par un ordinateur. Ce dernier élément de la chaîne

d'acquisition permet l'enregistrement des données mais permet également le contrôle des protocoles (imposition des voltages ou des courants). Nous utilisons la suite logiciel pClamp 9.2 (Molecular Devices, USA) pour l'imposition des protocoles et pour réaliser les enregistrements (Clampex) ainsi que pour l'analyse des signaux et des courants (Clampfit). Les signaux sont filtrés à 2 kHz par un filtre Bessel et échantillonnés à une fréquence de 10 kHz. Les expériences sont réalisées à température ambiante.



**Figure 30. Schéma de l'installation de patch clamp.**

A : Ordinateur, B : Carte de conversion analogique/numérique et numérique/analogique, C : Amplificateur de patch clamp, D : Microscope inversé, E : Table anti-vibration, F : Micromanipulateurs, G : Système de périfusion, H : Cage de Faraday. Modifié d'après la thèse de Marie Potier.

#### 4. Les pipettes de patch clamp

Un élément majeur dans la chaîne d'acquisition est l'électrode d'enregistrement. Ces pipettes de patch sont réalisées à partir de capillaires en verre que l'on étire par une succession de deux chauffages. La méthode utilisée au laboratoire est la méthode de double étirement sur une étireuse verticale. La qualité des mesures que nous réalisons est dépendante de plusieurs paramètres qui vont influencer sur la qualité de l'accolement de la pipette à la membrane, c'est-à-dire la qualité du « Gigaseal » :

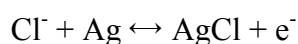
- la qualité des membranes cellulaires



- la nature du verre utilisé pour la réalisation des électrodes
- la forme des électrodes après étirement

Il existe différents types de verre pouvant être utilisés pour la réalisation des électrodes. Ces verres vont différer par leur composition chimique, leur propriété physique et leur température de fusion. Le choix du type se fera expérimentalement par la facilité à obtenir un Gigaseal et par la qualité des enregistrements obtenus. Les deux types utilisés couramment sont le verre de borosilicate, dit verre dur, ou le verre hématochrome, verre mou. Le verre dur possède une structure très régulière ce qui lui confère une température de fusion élevée. Ceci a tendance à donner une forme plus allongée de pipette. Sa conductance électrique est plus faible que celle du verre mou car sa paroi est plus épaisse, ce paramètre peut être facilement compensé. Le verre hématochrome a une structure très irrégulière ce qui entraîne une température de fusion plus basse. Ce type de verre permet d'obtenir des pipettes de forme souhaitée beaucoup plus facilement. Il est à noter que ce verre présente des capacités importantes qui peuvent altérer la qualité de l'enregistrement (altération de l'enregistrement des phénomènes rapides).

L'électrode est l'interface entre la cellule et le système d'enregistrement. Elle permet de transformer le courant ionique généré par les canaux ioniques en un courant électrique. L'électrode est constituée par la pipette de verre remplie de MIP dans lequel baigne une électrode d'argent chlorurée. Les courants ioniques seront transformés en courant électrique au niveau du filament d'argent par oxydo-réduction selon l'équation suivante :



La qualité du signal est dépendante de la chloruration du filament qui doit être la plus parfaite possible. Pour cela, nous la réalisons par trempage du filament dans de l'eau de javel (Hypochlorite de Sodium).

## 5. Solutions utilisées

La composition des solutions utilisées en patch-clamp influe énormément sur les enregistrements réalisés. Il est important de l'adapter au type cellulaire étudié ainsi qu'au type de canal ionique d'intérêt. Deux paramètres sont importants à prendre en considération : l'osmolarité de part et d'autre de la membrane ainsi que les valeurs de pH physiologique et bien sûr pour les KCa, les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  intra- et extracellulaires.

Dans le cadre de la configuration cellule entière que nous avons utilisée, il est nécessaire de préparer les solutions extracellulaire et intracellulaire. Le milieu de culture est remplacé lors des expérimentations électrophysiologiques par une solution physiologique saline (PSS) dont la composition est présentée dans le tableau 5 et le pH ajusté à 7,4 à l'aide de NaOH. L'osmolarité de ce milieu est contrôlée à l'aide d'un osmomètre et sa valeur se situe aux environs de 280 à 300 mOsm. En effet, l'utilisation du milieu de culture est peu satisfaisante en raison de la présence de protéines et de facteurs pouvant gêner la qualité du « seal » et l'équilibre du pH n'est plus maintenu sans l'apport de CO<sub>2</sub>.

Composés	Concentration en mM
NaCl	140
KCl	4
MgCl <sub>2</sub>	1
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0,33
CaCl <sub>2</sub>	2
HEPES	10
D-Glucose	11,5

**Tableau 5. Composition de la solution extra cellulaire (PSS).**

Le pH est ajusté à 7,4 par l'ajout de NaOH

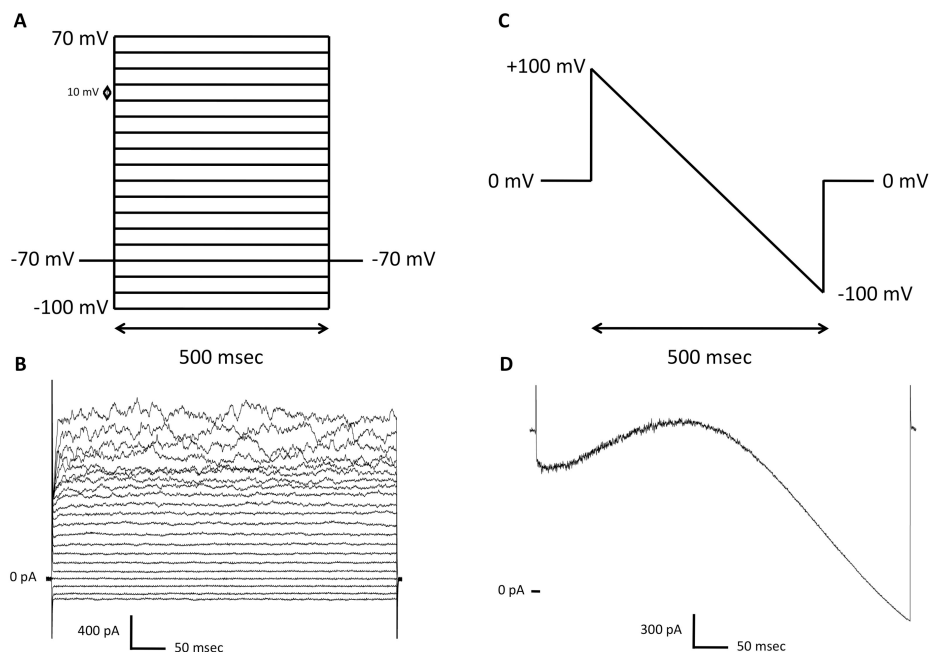
La préparation du milieu intra cellulaire est très importante également car celui ci va remplacer et dialyser le milieu original de la cellule. L'activité calcique ou concentration de Ca<sup>2+</sup> libre est un paramètre important pour l'étude des canaux SKCa et IKCa dont l'activité est régulée par le Ca<sup>2+</sup>. Nous avons donc réalisé des solutions présentant des PCa (activité calcique) variables. Afin de vérifier ce paramètre, nous avons utilisé une électrode à Ca<sup>2+</sup> (Réf. KWIKCAL, WPI, UK) permettant de mesurer précisément cette valeur. D'autre part, afin de se placer dans des conditions optimales d'enregistrement des canaux SKCa et IKCa dans le modèle d'expression HEK, nous avons décidé d'utiliser des conditions où la concentration en Cl<sup>-</sup> était équivalente de part et d'autre de la membrane. Dans ce cas le potentiel d'équilibre du chlore est à 0 mV, donc le courant enregistré à ce potentiel n'est pas un courant dû au chlore. Les différentes solutions utilisées pour les cellules MDA-MB-435s et HEK293 sont présentées dans le tableau 6.

	MDA-MB-435s			HEK293	
PCa	6	6,4	7	6	6,4
Composés	Concentration en mM				
K-Glutamate	125	125	125		
KCl	20	20	20	145	145
MgCl <sub>2</sub>	1	1	1	1	1
Mg-ATP	1	1	1	1	1
CaCl <sub>2</sub>	0,87	0,7	0,37	0,87	0,7
EGTA	1	1	1	1	1
HEPES	10	10	10	10	10

**Tableau 6. Composition des milieux intra pipette (MIP) utilisés en fonction des lignées et des activités calciques.**

## 6. Protocoles utilisés

Afin de mesurer l'activité des canaux dans les différents modèles cellulaires, nous avons utilisé différents protocoles. Concernant l'étude des cellules MDA-MB-435s, nous avons appliqué une succession de créneaux dépolarisants d'une durée de 500 msec par échelon de 10 mV de -100 mV à + 70 mV à partir d'un potentiel de maintien (« holding ») de -70 mV toutes les 5 secondes (Figure 31). Ce protocole nous permet de visualiser l'ensemble des courants présents dans la cellule et de tracer les courbes représentant la relation courant voltage (courbes I-V). Afin de réaliser ces traces nous moyennons l'amplitude du courant durant les 50 dernières millisecondes du créneau pour chaque voltage.



**Figure 31. Protocoles utilisés pour les expériences de patch clamp et exemples d'enregistrements.**

A. Protocole de créneaux dépolarisants appliqués aux cellules MDA-MB-435s. B. Exemple de courant obtenu sur une cellule MDA-MB-435s contrôle. C. Protocole de rampe appliqués aux cellules HEK 293. D. Exemple d'une rampe enregistrée sur une cellule HEK293 exprimant le canal SK3.

Dans le cas des cellules HEK293, nous avons choisi d'utiliser un protocole de rampe. Il s'agit d'une variation progressive du potentiel imposé de +100 mV à -100 mV en 500 msec à partir d'un potentiel de holding de 0 mV toutes les 4 secondes (Figure 29). Ce protocole nous permet de nous affranchir de certains courants endogènes activés par le voltage que nous avons pu observer sur des cellules contrôles. Le courant à 0 mV s'inactive. A partir des traces obtenues, nous avons réalisé trois mesures:

- l'amplitude du courant à +100 mV : ce point nous indique l'amplitude des courants globaux de la cellule ( $K^+$ ,  $Cl^-$ ).
- l'amplitude du courant à 0 mV : cette valeur représente dans nos conditions expérimentales l'amplitude du courant porté par le canal SK1, SK2, SK3 et IKCa.
- la pente aux environs du potentiel d'inversion : le calcul de la pente en ce point nous donne une information sur la conductance globale de la membrane, c'est à dire la capacité de la cellule à laisser passer les ions au travers de la membrane.

## 7. Limites de la technique de patch clamp

La première limite de la technique de patch clamp est dépendante du modèle utilisé. L'utilisation de cellules de grandes tailles avec de nombreux replis ou villosités entraîne des difficultés dans l'application d'un voltage donné. Dans ce cas, il est préférable d'adopter la technique de doubles électrodes ou alors d'utiliser une configuration en canal unitaire. En effet, lorsque la technique de patch clamp est appliquée à des cellules de petite taille, rondes et ne présentant pas de repli, le maintien du potentiel est homogène et rapide.

La seconde restriction porte sur la conception des expériences. En effet, la réalisation des milieux est un élément essentiel : chaque composant peut activer ou inhiber l'activité du canal. Par exemple, le passage d'un milieu avec sérum à un milieu salin sans sérum peut modifier le comportement des protéines comme le remplacement d'un tampon bicarbonate par un tampon HEPES. Il s'agit d'une technique robuste pour l'étude des courants ioniques mais cependant l'absence d'effet en utilisant la technique de patch clamp ne permet pas de conclure sur l'absence du rôle physiologique pour un canal. En effet, les canaux ioniques peuvent également être utilisés par la cellule en tant que protéine d'adhésion sans que la fonction pore ne soit nécessaire.

## IV. Expérimentation animale

Afin d'évaluer l'activité *in vivo* des alkyl-lipides, nous avons utilisé 3 modèles :

- un modèle permettant l'évaluation de la toxicité
- un modèle de métastases expérimentales
- un modèle de xénogreffe orthotopique

Les deux derniers modèles utilisés sont des modèles de cancer métastatique *in vivo*.

L'ensemble des expérimentations a été réalisé par le Dr Séverine Marionneau-Lambot et Mr Thibault Ouiller sur la plateforme *in vivo* de « l'Axe valorisation des produits de la mer en cancérologie » du Cancéropole Grand Ouest (Nantes).

### A. Préparation des composés

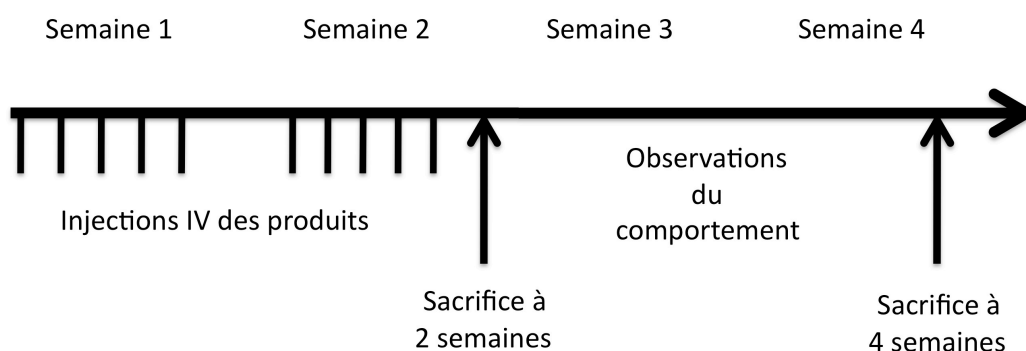
Dans la littérature, l'édelfosine a été testée à 30 mg/kg et à cette concentration, elle présente un effet sur la tumeur primaire. *In vitro*, nous avons montré que l'Ohmline n'avait pas d'effet sur la viabilité, nous avons donc choisi d'utiliser l'Ohmline à une concentration maximale de 30 mg/kg. Nous utiliserons également des concentrations inférieures pour être dans une gamme correspondante aux concentrations efficaces de manière spécifique sur la migration. Le second paramètre était le mode d'injection. Nous avons décidé de réaliser des injections par voie intraveineuse ce qui implique que les concentrations de solvants utilisées ne devaient pas dépasser 5 % du volume total injecté. Pour préparer l'Ohmline afin de l'utiliser à la dose de 30 mg/kg (dose la plus importante) et de respecter la contrainte de la quantité de solvant (< 5 %), il est nécessaire d'obtenir une solution mère à 200 mM (*in vitro*, la solution mère est à 10 mM). Lors des premiers essais, l'utilisation du DMSO ou de l'éthanol ou du PBS n'ont pas permis d'obtenir de solutions mères supérieures à 80 mM. Nous avons donc demandé conseil à l'équipe du Pr Lefort des Ylouses et du Dr Marchais qui sont chercheurs au laboratoire de Pharmacie Galénique et Pharmacotechnie Industrielle (Faculté de Pharmacie de Tours). La solubilisation des lipides amphiphiles n'est pas une pratique courante et nous avons testé différents mélanges éthanol/DMSO pour obtenir la meilleure solubilisation du JPH1701 (Ohmline) et nous avons retenu un mélange permettant d'obtenir une solution mère à 100 mM dans un mélange éthanol/DMSO (40 : 60, v/v). Malgré plusieurs essais en modifiant le

rapport des deux solvants, la concentration maximale ne dépassait pas 100 mM. Par conséquent, la dose maximale que nous pouvions utiliser pour les essais était de 15 mg/kg. La concentration de la solution mère permettant l'injection de cette dose est de 96,6 mM afin d'obtenir respectivement 2 % et 3 % d'éthanol et de DMSO dans la solution injectée.

Nous n'avons pas rencontré de problème de solubilisation avec l'édelfosine. Afin de se placer dans les mêmes conditions que le JPH1701 (Ohmlin), nous avons préparé une solution mère d'édelfosine à 120,5 mM dans le même mélange d'éthanol et de DMSO.

## B. Protocole d'évaluation de la toxicité

Ce protocole est utilisé en routine sur la plateforme dans le but de déterminer la toxicité des composés avant de tester les molécules sur des modèles murins développant des métastases. Cette étude se décompose en deux étapes sur une durée de quatre semaines (Figure 32). Le produit testé est administré par injection intraveineuse au niveau de la veine caudale de souris NMRI femelles de 6 semaines non cancéreuses (Janvier, France). Les injections sont quotidiennes durant quinze jours. A ce point, une partie des souris est sacrifiée afin d'observer les effets macroscopiques des composés sur les organes internes. Le groupe restant est conservé à l'animalerie pour les deux semaines suivantes. Pendant cette période, le comportement des souris est contrôlé. A la fin de cette deuxième étape, le sacrifice nous permet également de contrôler les effets des molécules sur les organes internes.



**Figure 32. Protocole d'évaluation de la toxicité de composés *in vivo*.**

L'étude que nous avons menée comprenait le test de deux composés : l'Ohmlin (JPH1701) et l'édelfosine. Ces produits ont été évalués à trois doses de 0,25 mg/kg, 2,5 mg/kg et 15 mg/kg. Les groupes réalisés pour mener à bien ce protocole sont détaillés dans les résultats.

Nous avons prélevé différents organes lors des sacrifices afin de mesurer l'incorporation des produits : estomac, rein, intestin, cœur, poumon, cerveau et foie.

### C. Modèle dit de métastases expérimentales et tests de molécules sur ce modèle

Ce protocole consiste à évaluer la capacité de cellules à coloniser des tissus, c'est à dire former des métastases après injections intraveineuses de ces dernières, sans qu'une tumeur primaire ne soit formée.

Nous utilisons des souris NMRI nude femelles âgées de six semaines. Les cellules MDA-MB-435s shRD (SK3+) exprimant la luciférase sont pré-traitées pendant 24 heures avant l'injection à des souris avec 1  $\mu$ M d'Ohmlin ou 1  $\mu$ M d'édelfosine ou la quantité équivalente de véhicule (DMSO 2 % / Ethanol 3 %) qui sera utilisé comme contrôle. 750000 cellules sont injectées dans la veine latérale de la queue. Trois groupes de souris sont établis :

- Groupe Ohmlin : un groupe traité par injection intraveineuse d'Ohmlin à 15 mg/kg, trois fois par semaine pendant 12 semaines
- Groupe Edelfosine : un groupe traité par injection intraveineuse d'édelfosine à 15 mg/kg, trois fois par semaine pendant 12 semaines
- Groupe Témoin : un groupe recevant des injections avec la dilution équivalente de véhicule, trois fois par semaine pendant 12 semaines

Le protocole est illustré figure 34. Toutes les souris sont imagées chaque semaine pour observer l'évolution du nombre et de la taille des métastases. Pour réaliser l'imagerie, les souris sont anesthésiées avec un mélange de kétamine / xylazine contenant 150 mg/kg de sel de K<sup>+</sup> de luciférine.

La bioluminescence (BLI) est mesurée avec un imageur ( $\Phi$ imageur<sup>TM</sup>; BIOSPACE Lab, France). Sa mesure est réalisée *in vivo* et *ex vivo*.

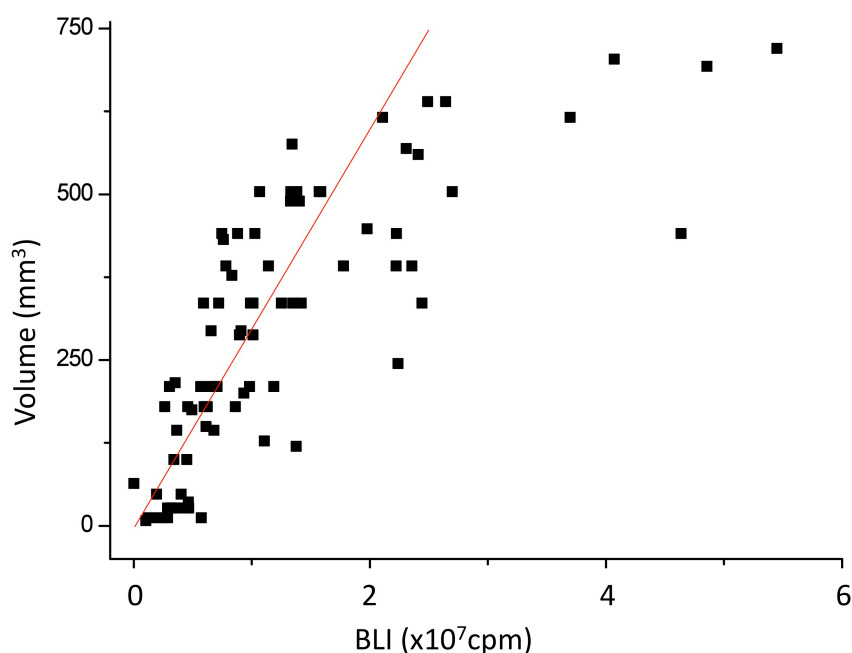
### D. Modèle de xénogreffe orthotopique

Ce modèle permet l'étude d'un cancer métastatique dans lequel il y a développement de la tumeur primaire et formation des métastases en parallèle du développement de la tumeur primaire.

Pour réaliser ce test, nous utilisons des souris NMRI nude femelles âgées de quatre semaines et nous préparons les cellules selon le même protocole que pour l'injection intraveineuse de cellules cancéreuses. En préparation de la greffe, le bourgeon mammaire des souris est cautérisé à l'aide du bistouri électrique puis 2 millions de cellules y sont implantées. Trois groupes de souris sont établis :

- Groupe Ohmline : un groupe traité par injection intraveineuse d'Ohmline à 15 mg/kg, trois fois par semaine pendant 14 semaines
- Groupe Edelfosine : un groupe traité par injection intraveineuse d'édelfosine à 15 mg/kg, trois fois par semaine pendant 14 semaines
- Groupe Témoin : un groupe recevant des injections avec la dilution équivalente de véhicule, trois fois par semaine pendant 14 semaines (groupe témoin)

Nous suivons le développement de la tumeur primaire par 2 approches : la mesure de la taille au pied à coulisse (longueur x largeur x épaisseur) ou par la mesure de la bioluminescence à l'aide du bioimageur. Il a été déterminé au laboratoire que l'évolution du volume de la tumeur primaire est corrélée de manière linéaire avec la BLI jusqu'à  $600 \text{ mm}^3$  (données non publiées) (Figure 33).

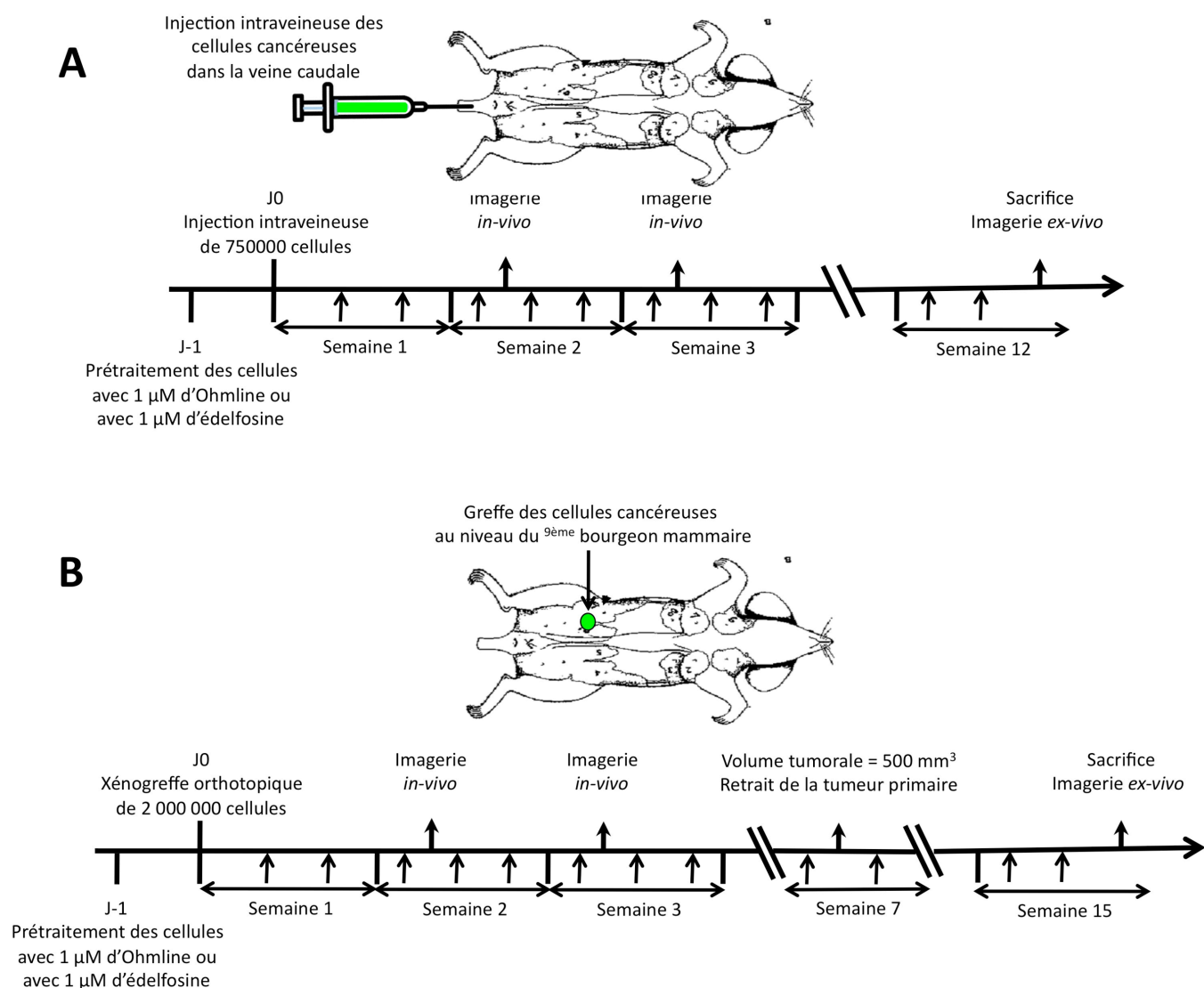


**Figure 33. Corrélation entre volume de la tumeur primaire et l'intensité de BLI pour les cellules MDA-MB-435s shRD (SK3+).**

Quand la tumeur primaire atteint la taille de  $500 \text{ mm}^3$ , c'est à dire six à sept semaines après la greffe, une exérèse totale est réalisée. L'expérimentation continue pendant environ huit semaines après le retrait de la tumeur primaire avec la poursuite des injections des éther-



lipides ou de véhicule. Après environ 15 semaines, nous sacrifions les souris. Selon le même protocole que pour le test des métastases expérimentales, nous réalisons une injection de luciférine avant le sacrifice afin de pouvoir réaliser l'imagerie de l'animal entier puis pour chaque organe prélevé. Le protocole est illustré figure 34.



**Figure 34. Protocoles utilisés pour les expérimentations animales.**

A. Protocole dit de « métastases expérimentales ». B. Protocole de xélogreffe orthotopique.

↑ = injection de l'Ohmlin, de l'édelfosine ou du véhicule

## E. Mesure de l'incorporation des molécules dans les tissus

Afin de déterminer la quantité d'édelfosine ou d'Ohmlin dans les tissus, nous avons récupéré lors des autopsies les organes suivants des souris développant un cancer métastatique ou non et recevant des injections des éther-lipides: rein, intestin, foie, cerveau cœur, estomac et

poumon. Lors de l'utilisation du modèle de xéngreffe orthotopique, nous avons également prélevé la tumeur primaire et les os des pattes et le rachis. Le protocole permettant la quantification présente trois étapes : (i) les tissus sont broyés afin d'extraire les lipides totaux puis (ii) les éther-lipides sont séparés des ester-lipides par la réaction de vitride (hydrure de sodium et d'aluminium) et (iii) les éther-lipides séparés sont déposés sur une plaque HPTLC pour y être quantifiés.

#### a) Préparation des échantillons

##### (i) Extraction des lipides totaux

La technique d'extraction repose sur la méthode de Folch *et al.* (Folch, J. *et al.*, 1957). Les organes sont placés dans un mélange chloroforme/méthanol (2 : 1 ; v/v) et broyés mécaniquement. L'homogénat obtenu est filtré. Le filtrat est mélangé avec du NaCl à 0,73 % puis centrifugé. La phase supérieure aqueuse est éliminée. La phase chloroformique, qui contient les lipides, est récupérée.

##### (ii) Réaction d'hydrogènyse

Afin d'isoler les éther-lipides des autres lipides, une réaction d'hydrolyse en présence d'hydrure de sodium et d'aluminium est réalisée. Il s'agit de la réaction de vitride (Mangold, H. K. *et al.*, 1983). Cette réaction permet de réduire spécifiquement les liaisons esters en laissant intactes les liaisons éthers. Un mélange comprenant des alcools gras, les groupements phospho-X des phospholipides, les éther-glycérols endogènes et les composés d'intérêts est récupéré.

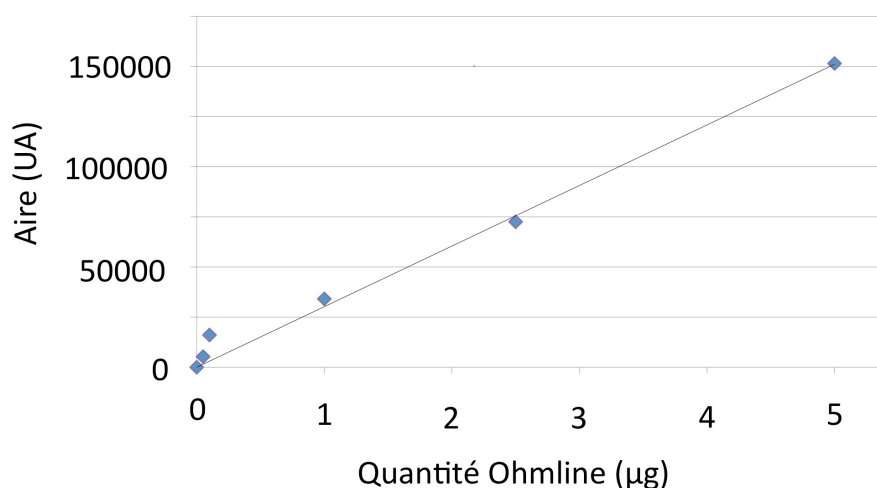
#### b) Séparation des échantillons par chromatographie sur couche mince

Environ 1/100<sup>ème</sup> de l'échantillon est déposé de manière semi-automatique sur la plaque de migration par un Linomat 5 (CAMAG, Suisse). La séparation a été réalisée par chromatographie sur plaque HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography). Le solvant utilisé pour la migration est un mélange chloroforme/méthanol (85 : 15, v/v). La cuve utilisée pour cette étude est une cuve automatique permettant de réaliser une migration dans un mode autonome, reproductible et indépendant des conditions environnementales (température, humidité). Après migration, la plaque est séchée deux heures sous sorbonne puis révélée par un mélange acide sulfurique/éthanol (10 volume d'acide sulfurique 12 M +

90 volume d'éthanol absolu) pendant 5 minutes et enfin placée sur une plaque chauffante (130°C) pendant 20 minutes.

### c) Quantification des échantillons par densitométrie

La première étape consiste à réaliser l'acquisition numérique à l'aide du TLC Visualizer (CAMAG, Suisse) en haute résolution. Le cliché obtenu est retraité avec le logiciel winCATS (CAMAG, Suisse) puis analysé avec Videoscan (CAMAG, Suisse). Les taches de la plaque sont intégrées (surface x intensité de coloration). La quantité d'Ohmline ou d'édelfosine est estimée à l'aide de la courbe étalon et du coefficient directeur (pour exemple, Figure 35). Nous normalisons les quantités obtenues à la quantité de lipides totaux de l'organe, ce qui permet la comparaison des résultats entre les expériences.



**Figure 35. Exemple de courbe d'étalonnage obtenue pour l'Ohmline.**

Le coefficient directeur est déterminé graphiquement (ex : 30223).

## F. Analyse des résultats *in vivo*

Dans le but de quantifier l'effet des molécules, nous avons cherché à nous approcher des évaluations réalisées en clinique. Afin de pouvoir comparer l'évolution des métastases dans un modèle hétérogène, nous avons attribué un score à l'intensité de BLI et au nombre des métastases afin de déterminer un score métastatique. La correspondance entre les intensités de bioluminescence et les points attribués pour chaque organe sont présentés dans le tableau 7.

Pour le nombre de métastases, les points sont attribués de la manière suivante. Si la souris présente une métastase à une patte antérieure ou bien aux deux pattes antérieures, la souris obtient 1 point. Le même raisonnement est appliqué pour les pattes arrières, la colonne, les poumons (au moins 1 lobe) et les ganglions (au moins 1).

Prenons l'exemple d'une souris ayant une intensité moyenne de BLI *in vivo* de  $3,97.10^5$  CPM, une intensité moyenne de BLI de  $1,85.10^2$  CPM pour les pattes antérieures, une intensité moyenne de BLI de  $2,54.10^3$  CPM pour les pattes postérieures, une intensité moyenne de BLI de  $1,36.10^2$  CPM pour la colonne et une intensité moyenne de BLI de  $6,98.10^6$  CPM pour les poumons. Cette souris obtient le score BLI de  $2+1+2+1+3$  soit 9 points. Pour la fréquence, elle présente des métastases à 1 patte antérieure, 2 pattes postérieures, à la colonne et aux 2 poumons. Ceci correspond à un score de 4. Le score métastatique de cette souris sera donc de 13.

A l'aide de ce score, nous pouvons comparer les différents groupes et ainsi évaluer l'effet d'un composé.

Organes	Intensité moyenne de la BLI (CPM)	Point
Poumons	$10^1 - 10^3$	1
	$10^4 - 10^5$	2
	$10^6 - 10^7$	3
Os	$10^1 - 10^2$	1
	$10^3 - 10^4$	2
	$10^5 - 10^6$	3
Animal entier	$10^1 - 10^4$	1
	$10^5$	2
	$10^6 - 10^7$	3

**Tableau 7. Correspondance entre les intensités BLI et le nombre de points attribués pour établir le score métastatique.**

## V. Analyses et statistiques

Pour l'ensemble des expérimentations, les résultats ont été traités à l'aide des logiciels Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) et Origin 7 (OriginLab, Northampton, USA). Les données sont représentées sous la forme de moyennes plus ou moins l'erreur standard à la moyenne (SEM) ou sous la forme de médianes. L'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel SigmaStat (Systat Software, San Jose, USA). Les tests utilisés sont adaptés aux échantillons (test de la somme des rangs ou test T de Student par exemple pour comparer 2 groupes ou ANOVA et test des rangs pour comparer plusieurs groupes).

## **Résultats et Discussion**

# I. Le canal SK3 : une nouvelle cible des éther-lipides

Les résultats obtenus lors de cette étude font l'objet d'un article soumis dans le journal « Current Cancer Drug Target » en cours de révision (Référence BSP-CCDT-2010-178) :

## « New alkyl-lipid blockers of SK3 channels reduce cancer cell migration and metastasis occurrence »

Alban Girault, Jean-Pierre Haelters, Marie Potier, Aurelie Chantome, Michelle Pinault, Severinne Marionneau-Lambot, Thibauld Oullier, Gaelle Simon, Helene Couthon-Gourves, Paul-Alain Jaffres, Bernard Corbel, Philippe Bognoux, Virginie Joulin, Christophe Vandier.

Par ailleurs, les molécules sélectionnées après l'étude de la relation entre la structure et l'activité de l'édelfosine sont actuellement protégées par le dépôt d'un brevet (Numéro de dépôt EP10305169.4) intitulé :

## « A method for preventing and treating cancer metastasis »

Philippe Bognoux, Aurélie Chantôme, Bernard Corbel, Alban Girault, Jean-Pierre Haelters, Virginie Joulin, Marie Potier-Cartreau, Gaelle Simon, Christophe Vandier.

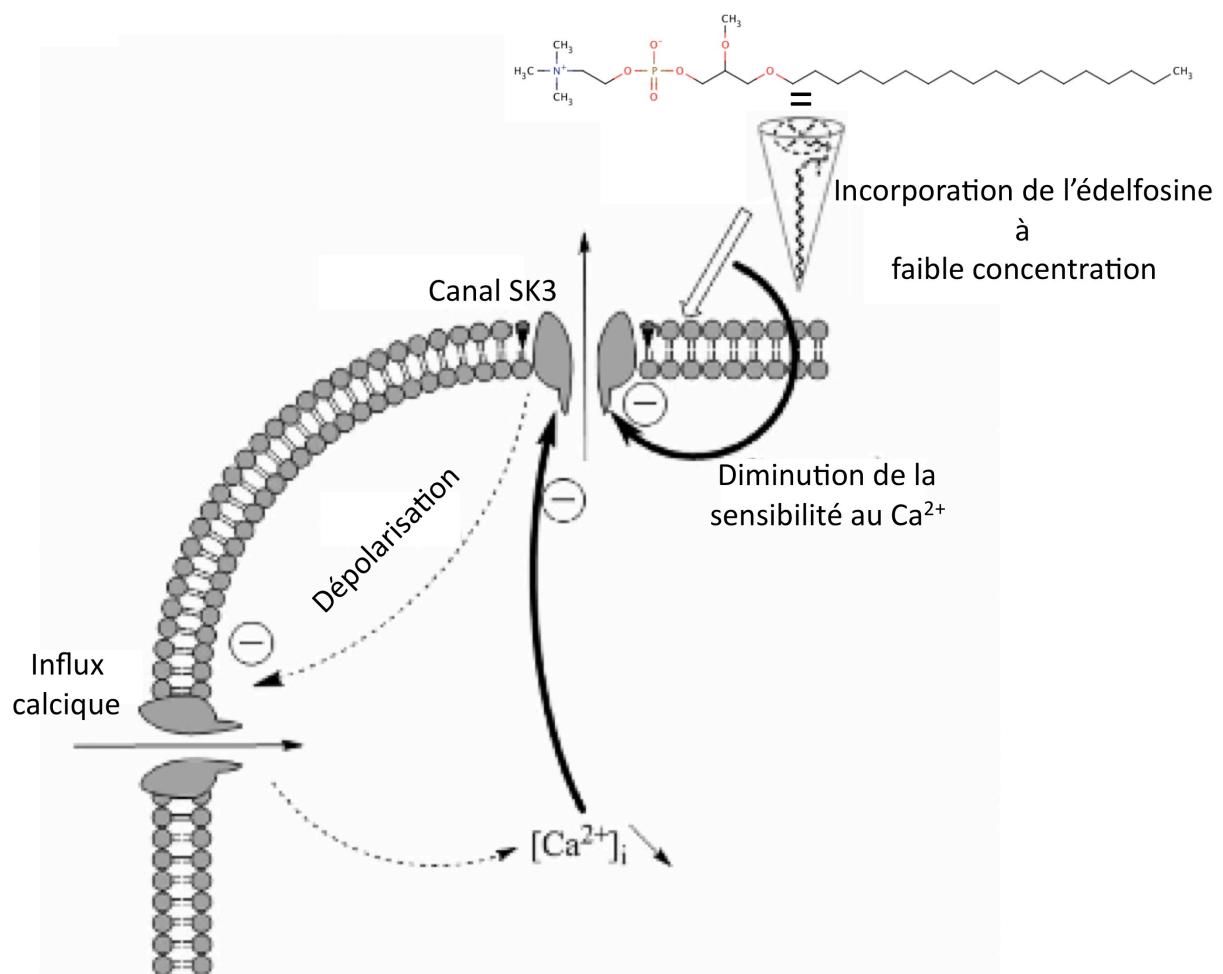
### A. Brefs rappels des effets cellulaires de l'édelfosine

L'édelfosine est le prototype de la classe des alkylglycerophospholipides (APL) anticancéreux et possède de nombreuses activités anti tumorales comme nous l'avons décrit précédemment. Son activité a été très étudiée dans le cas de leucémie mais a été beaucoup moins documentée sur les tumeurs solides. Par ailleurs, si ses effets sur le développement de la tumeur primaire ont été étudiés, il n'y a eu aucune étude précisant son activité sur le développement de métastases.

Récemment, il a été mis en évidence au laboratoire que l'édelfosine pouvait inhiber la migration de cellules épithéliales mammaires cancéreuses très métastasiées, les cellules MDA-MB-435s, en inhibant l'activité du canal SK3 (Potier, M. *et al.*, 2011).

Dans cette étude, nous avons montré que l'édelfosine réduit la prolifération des cellules MDA-MB-435s pour des concentrations supérieures à 1  $\mu$ M et commence à être toxique dès

En résumé, cette étude présente pour la première fois que l'édelfosine inhibe l'activité d'un canal ionique impliqué dans la migration cellulaire. Le mécanisme d'action de l'édelfosine supposé est présenté dans la figure 36. L'édelfosine en s'intégrant dans la membrane va modifier la sensibilité du canal SK3 au  $\text{Ca}^{2+}$  ce qui réduit son activité. Par conséquent, la membrane est plus dépolarisée ce qui diminue le gradient électrochimique du  $\text{Ca}^{2+}$ . Ceci implique que l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  diminue et par conséquent l'activité du canal SK3 est réduite.



Modifié d'après Potier *et al.*, 2011, BJP.

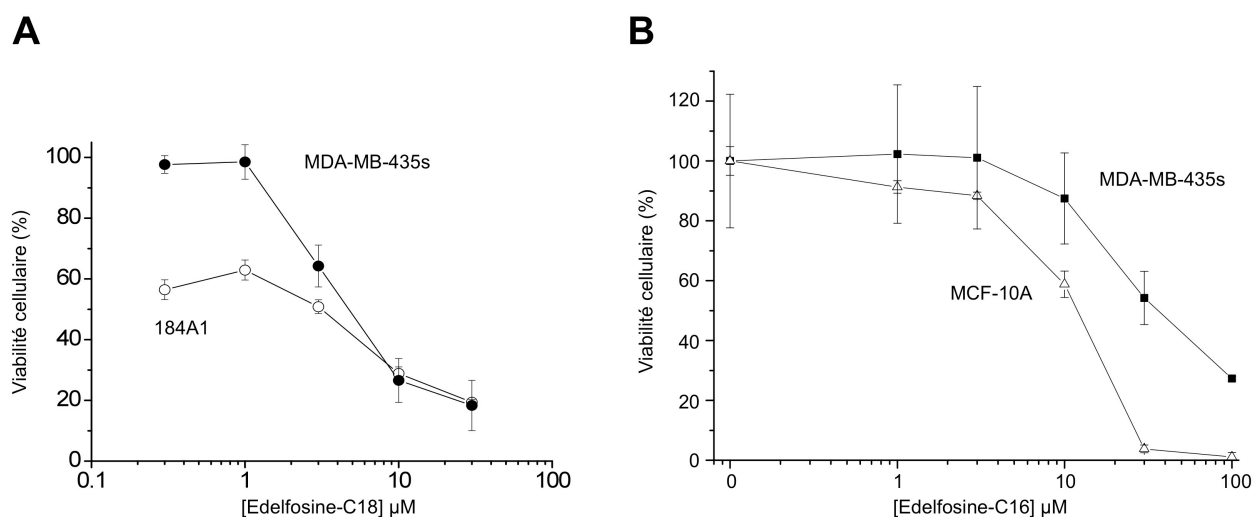


## B. Etude de la relation entre la structure et l'activité de l'édelfosine vis-à-vis du canal SK3 : sélection de l'Ohmline

### 1. Effets de l'édelfosine sur la viabilité cellulaire

Certains effets délétères et toxiques de l'édelfosine pourraient s'expliquer par son activité non sélective sur les cellules cancéreuses et par ses effets sur les cellules non cancéreuses. Nous avons alors évalué l'activité de l'édelfosine sur des lignées de cellules épithéliales mammaires non cancéreuses, les cellules MCF-10A et les cellules 184A1 et nous l'avons comparée à celle mesurée sur les cellules cancéreuses MDA-MB-435s.

La toxicité de l'édelfosine, et de ses analogues, a été évaluée par leurs effets sur la viabilité cellulaire à 24 heures. L'édelfosine possédant 18 atomes de carbone (édelfosine-C18) sur le *sn*-1 diminue de 50 % la viabilité cellulaire dès 0,3  $\mu$ M sur les cellules 184A1 alors qu'elle n'affecte la viabilité des MDA-MB-435s qu'à des concentrations supérieures à 1  $\mu$ M ( $IC_{50}$  = 5  $\mu$ M) (Figure 37). Par ailleurs, l'édelfosine avec une chaîne à 16 atomes de carbone (édelfosine-C16) en *sn*-1 est plus toxique pour les cellules non cancéreuses MCF-10A ( $IC_{50}$  = 10  $\mu$ M) que pour les cellules cancéreuses MDA-MB-435s ( $IC_{50}$  = 30  $\mu$ M) (Figure 37).



**Figure 37. Toxicité de l'édelfosine-C18 et de l'édelfosine-C16 sur les cellules épithéliales non cancéreuses et sur les cellules cancéreuses MDA-MB-435s.**

A. Toxicité de l'édelfosine-C18 sur les cellules épithéliales non cancéreuses 184A1 et cancéreuses MDA-MB-435s. B. Toxicité de l'édelfosine-C16 sur les cellules épithéliales non cancéreuses MCF-10A et cancéreuses MDA-MB-435s.

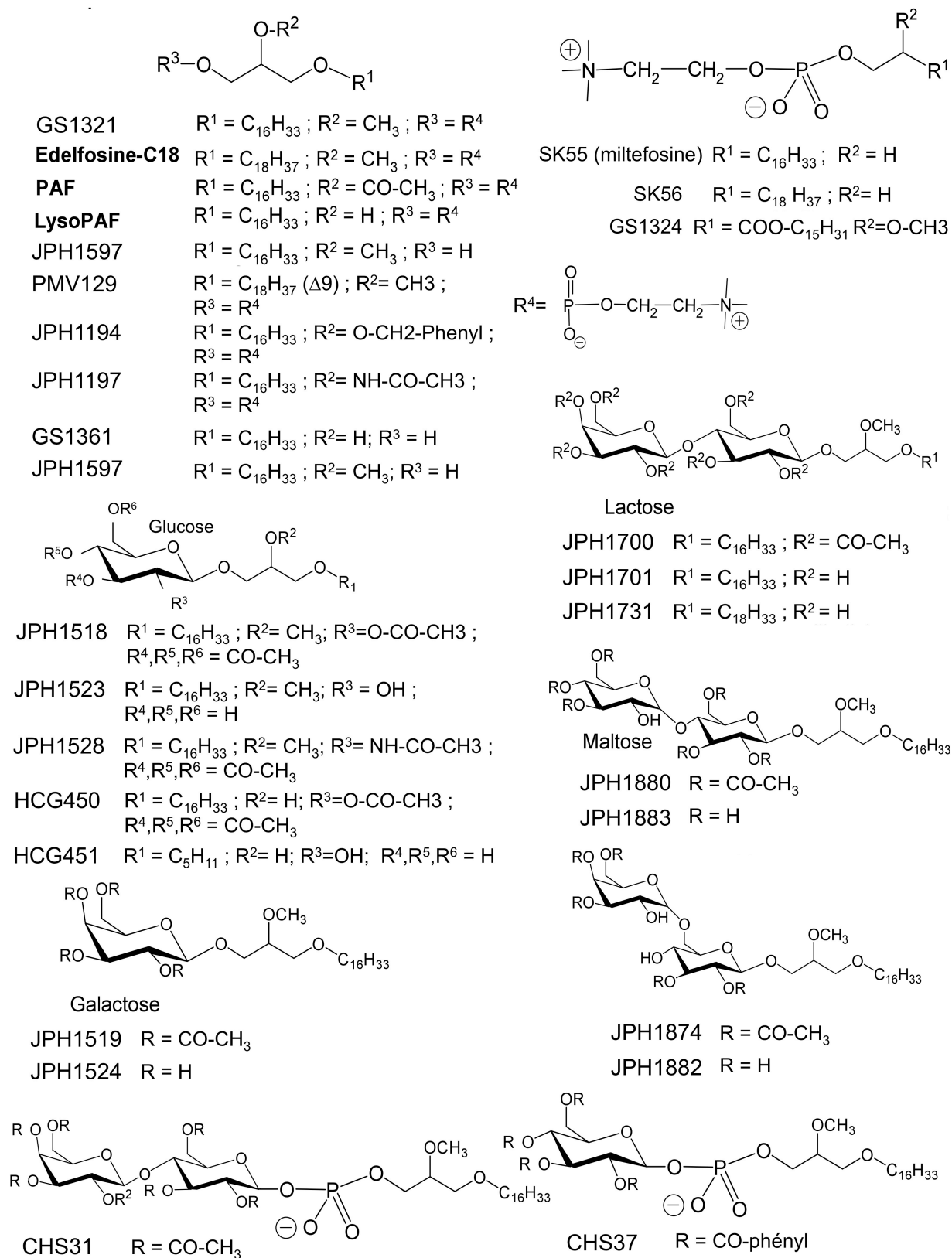
Quelle que soit la longueur de la chaîne en *sn*-1, il apparaît que les cellules épithéliales non cancéreuses sont plus sensibles à l'édelfosine que les cellules épithéliales cancéreuses et que cette différence est de l'ordre d'un facteur 3. Par ailleurs, l'édelfosine-C16 est environ 6 fois moins toxique que l'édelfosine-C18. Ces résultats suggèrent que certains effets délétères de l'édelfosine observés lors de son utilisation en clinique puissent être attribués à ces effets sur les cellules normales et que l'utilisation de l'édelfosine-C16 serait plus adaptée.

## 2. Synthèse de nouveaux analogues de l'édelfosine et tests sur la migration cellulaire des MDA-MB-435s.

Nous nous sommes attachés à réaliser une étude de la relation entre la structure et l'activité de l'édelfosine sur le canal SK3 afin de déterminer quelles étaient les parties de la molécule indispensables à son activité inhibitrice de la migration cellulaire et du canal SK3. Le but étant de sélectionner des analogues moins toxiques mais conservant la capacité d'inhiber le canal SK3 et la migration.

En collaboration avec Jean-Pierre Haelters, Paul-Alain Jaffrès, Hélène Couthon-Gourves, Gaëlle Simon et Charlotte Sevrain, de l'Université de Brest, nous avons évalué, sur la migration cellulaire et sur le canal SK3, l'activité de nouveaux analogues synthétiques de l'édelfosine (Figure 38) qui possèdent les modifications suivantes :

- Retrait du squelette glycérol
- Modification du *sn*-1 : substitution de la liaison éther par une liaison ester, modification de la longueur de la chaîne ou ajout d'insaturation
- modification et retrait du groupement méthoxy situé en *sn*-2
- substitution ou retrait de la phosphocholine en *sn*-3



**Figure 38. Structure des composés utilisés lors de l'étude de relation entre la structure et l'activité de l'édelfosine.**

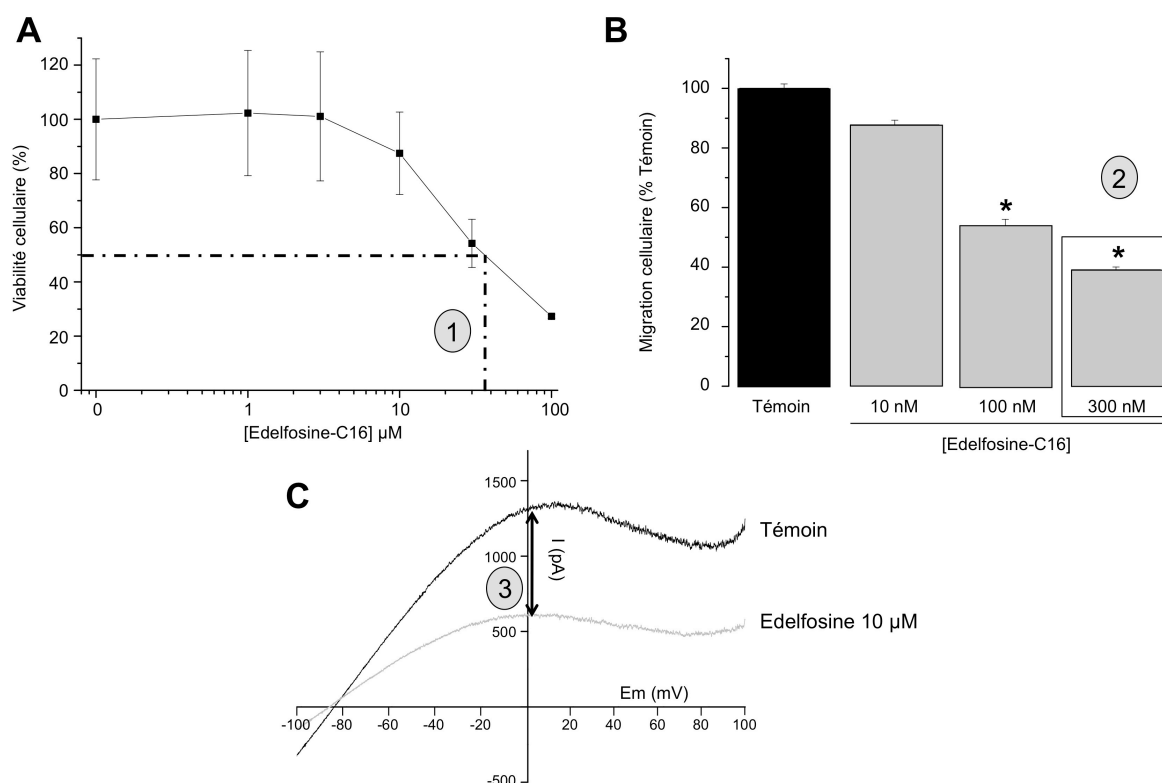
La toxicité des analogues a été testée ainsi que leur capacité à inhiber la migration des cellules MDA-MB-435s. Les effets de certains composés sur l'activité du canal SK3 ont été mesurés en patch clamp. Un bilan des résultats est présenté dans le tableau 8.

Modifications	Composés	Toxicité à 1 $\mu$ M	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	% d'inhibition de la migration (300 nM)	% d'inhibition du courant à 0 mV
	Edelfosine	+	$\approx 5$	80	50
Squelette glycérol	SK55 (Miltéfosine)	+	$\approx 10$	20	NT
	SK56	+	$\approx 20$	NT	NT
Chaîne carbonée <i>sn</i> -1	GS1321 (Edelfosine-C16)	+	$\approx 30$	60	NT
	GS1324	+	$\approx 5$	50	NT
	PMV-129	NT	NT	NT	57
Groupe méthoxy <i>sn</i> -2	LysoPAF	-	ND	0	NT
	PAF	-	ND	0	+33
	JPH1194	-	$\approx 50$	30	NT
	JPH1197 (activateur)	-	$\approx 50$	+100	NT
Groupement phospho-choline	JPH1597	-	$\approx 50$	0	NT
	JPH1518	-	ND	30	NT
	JPH1523	-	ND	50	48
	JPH1519	-	$\approx 30$	20	NT
	JPH1524	-	$\approx 10$	20	NT
	JPH1528	-	>100	50	66
	JPH1700	-	ND	NT	23
	JPH1701 / Ohmline	-	ND	50	73
	JPH1731	-	$\approx 20$	30	NT
	JPH1874	-	ND	20	38
	JPH1880	-	ND	20	40
	JPH1882	-	ND	NT	55
	JPH1883	-	ND	NT	NT
	CHS31	-	ND	NT	46
	CHS37	-	ND	NT	5
Modifications multiples	GS1361	-	ND	40	NT
	HCG450	-	$\approx 30$	NT	NT
	HCG451	-	ND	0	1

**Tableau 8. Résultats de l'étude structure activité des analogues de l'édelfosine.**

JPH pour Jean-Pierre Haelters ; GS pour Gaëlle Simon ; PMV pour Paul Mosset ; CHS pour Charlotte Sevrain ; HCG pour Hélène Couthon-Gourves ; ND : Non déterminé ; NT : Non testé.

Le GS1321 (édelfosine-C16) est utilisé comme molécule de référence car sa toxicité est moins importante que l'édelfosine-C18 et son activité sur la migration est proche de l'édelfosine-C18. Nous avons donc comparé les activités des analogues à celle de l'édelfosine-C16. Pour cela trois paramètres ont été utilisés :  $IC_{50}$  (1), le pourcentage d'inhibition de la migration cellulaire à 300 nM (2) et le pourcentage d'inhibition de l'amplitude du courant SK3 à 0 mV (3) (Figure 39).



**Figure 39. Effets de l'édelfosine-C16 sur les MDA-MB-435s et sur le courant SK3.**

A. Viabilité cellulaire des MDA-MB-435s après 24 heures de traitement avec des doses croissantes d'édelfosine-C16. B. Inhibition de la migration cellulaire des MDA-MB-435s. L'inhibition est dose dépendante. A 300 nM, l'édelfosine-C16 inhibe 60 % de la migration cellulaire. C. Illustration de l'inhibition du courant SK3 dans les cellules HEK-SK3. Les paramètres utilisés pour la comparaison des analogues sont (1) l' $IC_{50}$  sur la viabilité cellulaire, (2) le pourcentage d'inhibition de la migration à 300 nM et (3) le pourcentage d'inhibition de l'amplitude du courant SK3 à 0 mV.

L'analyse des résultats obtenus avec les différents analogues nous a permis de déterminer les parties essentielles de l'édelfosine nécessaires à l'inhibition de la migration dépendante et de l'activité du canal SK3.

#### a) Analogues n'ayant plus le squelette glycérol

La miltéfosine (ou SK55, chaîne à 16 atomes de carbone), qui appartient au groupe des alkyl-phosphocholines (sans squelette glycérol, APC), est plus toxique que l'édelfosine-C16 sur les

MDA-MB-435s ( $IC_{50} = 10 \mu M$ ). Par ailleurs, la miltéfosine entraîne une diminution de 20 % de la migration cellulaire à 300 nM (Tableau 8). Elle est donc moins active que le GS1321. L'augmentation de la longueur de la chaîne de deux atomes de carbone (SK56) diminue sa toxicité sur les MDA-MB-435s ( $IC_{50} = 20 \mu M$ ). La présence du squelette glycérol est importante pour l'activité de l'édelfosine sur la migration (Tableau 8).

#### b) Modifications de la chaîne carbonée située en *sn*-1

Concernant la chaîne en *sn*-1, nous avons déjà montré que la diminution de la longueur de la chaîne de l'édelfosine entraîne une diminution de la toxicité mais cela affecte peu l'efficacité sur la migration. L'utilisation de l'édelfosine-C16 entraîne une diminution de 60 % de la migration cellulaire (Figure 39), qui est légèrement inférieure à celle observée pour l'édelfosine-C18 (80 %) (Tableau 8). La suppression de la liaison éther a été évaluée. Le GS1324 présente une toxicité équivalente à l'édelfosine mais son activité sur la migration est diminuée comparée à celle-ci (Tableau 8). Le GS1324 sera un analogue difficilement utilisable *in vivo*. En effet, l'intérêt de la présence de la liaison éther est de procurer une stabilité importante aux éther-lipides comparée à celle des composés présentant une liaison ester. L'élément important de ces analogues est la liaison éther qui est impliquée dans l'activité sur la migration. Par ailleurs, nous avons également évalué l'effet d'une insaturation en *sn*-1. Le PMV-129 a été évalué sur l'activité du canal. Il diminue le courant SK3 d'environ 55 % (Tableau 8).

#### c) Modifications du groupement méthoxy en *sn*-2

Le groupement méthoxy situé en *sn*-2 a été substitué par trois groupements : un groupement hydroxyle (lysoPAF), un groupement acétyl (PAF) ou un groupement méthoxyphényl (JPH1194). Le PAF et le lysoPAF n'affectent pas la viabilité des cellules jusqu'à 100  $\mu M$  et n'ont aucun effet sur la migration cellulaire (Tableau 8).

Il est intéressant de noter que malgré l'absence d'effet du PAF sur la migration, une application aiguë de PAF provoque une augmentation de l'amplitude du courant SK3 (Tableau 8). Deux hypothèses sont alors possibles : le PAF active directement le canal SK3 ou le PAF entraîne une augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire qui active secondairement le canal. Le JPH1194 présente une toxicité plus faible que l'édelfosine sur les MDA-MB-435s et son activité inhibitrice de la migration est également diminuée (30 % de diminution à 300 nM) (Tableau 8). Le groupement porté en *sn*-2 est très important car sa modification entraîne

rapidement une diminution voire une perte d'efficacité des molécules vis-à-vis de la migration et de SK3.

D'autre part, la substitution du groupe méthoxy par un groupement NH-CO-CH<sub>3</sub> (JPH1197) change complètement les propriétés de ce composé envers le canal SK3. En effet, cette molécule présente, de manière surprenante, une forte activation de la migration dépendante du canal SK3 des cellules MDA-MB-435s (Tableau 8). Il serait intéressant de poursuivre l'étude de ce composé car les composés activateurs des canaux SKCa peuvent ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques dans certaines pathologies (hypertension ou hyperexcitabilité neuronale).

#### d) Substitution du groupement phosphocholine

La suppression du groupement phosphocholine (substitution par un groupement hydroxyle, JPH1597) provoque une diminution de la toxicité de l'édelfosine (IC<sub>50</sub> > 50 µM) mais abolit complètement son activité anti-migratoire (Tableau 8). Un analogue de l'édelfosine, le GS1361, ne présentant ni le groupement méthoxy ni la tête phosphocholine présente une activité surprenante. Alors que le lyso-PAF (substitution du *sn*-2 par un hydroxyle) et le JPH1597 (substitution du *sn*-3 par un hydroxyle) n'ont aucun effet sur la migration, le GS1361 inhibe 40 % de la motilité cellulaire à 300 nM (Tableau 8). Cependant, une utilisation de ce composé *in vivo* semble compromise par le fait qu'il pourrait servir de substrat pour la synthèse de PAF ou de tout autre éther-lipide membranaire.

Nous avons choisi de rajouter des groupements sucrés en substitution de la phosphocholine (Figure 38). Nous avons fait ce choix par analogie à des études relatives à un autre canal potassique, le TREK-1. Ce dernier est activé par des lipides ayant une forme de cône inversé et possédant une tête polaire volumineuse (Maingret, F. *et al.*, 2000). L'effet sur le canal TREK-1 est de plus en plus important avec l'augmentation de la taille de la tête polaire (phosphocholine puis phosphoinositol). Notre hypothèse était que le remplacement du groupement phosphocholine de l'édelfosine par un groupement saccharidique augmente l'activité inhibitrice des analogues sur la migration cellulaire et sur le canal SK3.

La substitution de la phosphocholine par des groupements mono-saccharadiques (β glucose acétylé = JPH1518 ; β glucose = JPH1523 ; β galactose acétylé = JPH1519 ; β galactose = JPH1524) produit des composés ne présentant pas ou peu de toxicité et qui sont efficaces sur la migration cellulaire (de 20 % à 50 % d'inhibition respectivement pour JPH1519 = JPH1524 (20 %) < JPH1518 (30 %) < JPH1523 (50 %)) (Tableau 8). Les composés acétylés correspondent à des intermédiaires de synthèse. Le groupement acétyle présent sur les

fonctions -OH des groupes osidiques permet leur protection lors des étapes finales de la synthèse des composés. Le JPH1523, le composé le plus efficace de la série, a également été évalué sur l'activité du canal SK3 et entraîne une diminution de 50 % du courant SK3. Par ailleurs, des composés avec des sucres en *sn*-3 présentant des modifications multiples (substitution du groupement méthoxy par un groupe hydroxyle et chaîne carbonée à 5 atomes de carbone, HCG450 et HCG451) entraînent une perte d'activité totale des molécules sur la migration, ce qui confirme l'importance d'une chaîne longue en *sn*-1 et du groupement méthoxy en *sn*-2. Afin de faire varier l'encombrement, nous avons évalué un composé qui présente une substitution du groupement phosphocholine par une acétylglucosamine (JPH1528). Cet analogue provoque une diminution de la toxicité et une inhibition importante de la migration similaire à celle observée pour le JPH1523 (50 %). Son effet sur l'activité du canal SK3 est un peu plus importante que le JPH1523 (environ 60 % d'inhibition) (Tableau 8). Les résultats obtenus avec ce groupe présentant un monosaccharide en *sn*-3 indiquent que la tête polaire est essentielle pour l'activité de l'édelfosine sur la migration et sur le canal SK3.

Afin d'augmenter la tête polaire, nous avons décidé d'utiliser des groupements dissacharidiques (Figure 38). Des composés présentant ces groupes avec deux sucres en substitution de la phosphocholine montrent une activité inhibitrice de la migration cellulaire équivalente à celle de l'édelfosine mais n'ont aucun effet toxique (Tableau 8). Le composé le plus efficace est le JPH1701 qui possède un  $\beta$  lactose. Ce composé inhibe plus de 50 % de la migration à 300 nM et inhibe environ 75 % du courant SK3. De façon surprenante, un allongement de la chaîne en *sn*-1 (18 atomes de carbone au lieu de 16, JPH1731) entraîne une diminution des effets inhibiteurs sur la migration et sur l'activité du canal. Pour évaluer la taille maximale de la tête polaire, nous avons testé le CHS37 dans lequel la phosphocholine est substituée par un phosphoglucose dont tous les groupements hydroxyles du motif saccharidique sont protégés par un groupement benzoyle. Ce composé ne présente plus aucune activité inhibitrice du courant SK3 (Tableau 8). L'encombrement de la tête polaire de ce composé doit être trop importante. De plus, l'ajout des groupements phényles sur le glucose peut changer l'hydrophilie du composé et donc modifier ces propriétés d'incorporation dans la membrane.

Nous avons voulu estimer l'activité de composés avec d'autres groupements dissacharidiques en faisant varier le type de liaison entre les sucres et le type d'oses impliqués. Le remplacement du lactose par un mélibiose (JPH1882) ou par un maltose (JPH1883) réduit



l'efficacité des composés par rapport au JPH1701 (Tableau 8). Il faut noter que les groupements acétyles sur les groupes -OH du lactose (analogue JPH1700), du mélibiose (analogue JPH1874) ou du maltose (analogue JPH1880) diminuent l'efficacité de ces analogues dissacharidiques. Le groupement  $\beta$  lactose est le substituant le plus efficace conduisant au composé JPH1701 qui présente une absence de toxicité et qui est efficace sur la migration et sur le canal SK3.

Il était également intéressant d'évaluer l'importance du groupement phosphate. Nous avons donc testé un composé présentant un phospholactose en substitution du lactose (CHS31). Cet analogue ne présente pas de toxicité mais entraîne une inhibition du canal inférieure au JPH1701 (Tableau 8). Ce groupement phosphate n'est donc pas forcément indispensable à l'activité inhibitrice de SK3. Il faut cependant noter que l'ajout de ce groupement rend la solubilisation du JPH1701 plus facile. Il faudrait vérifier si l'ajout d'une charge négative pourrait entraîner une perte de sélectivité de l'Ohmline vis-à-vis du canal SK3 (actif sur des canaux sensibles au voltage en raison des charges présentes sur leurs segments S4).

#### e) Bilan de l'étude structure activité

Les résultats indiquent que pour obtenir une molécule active sur le canal SK3 et sur la migration cellulaire, il faut qu'elle présente (i) un squelette glycérol, (ii) une chaîne de 16 à 18 atomes de carbone, saturée ou non, liée au glycérol par une liaison éther en *sn*-1, (iii) un groupement méthoxy en *sn*-2 et (iv) une tête polaire en *sn*-3.

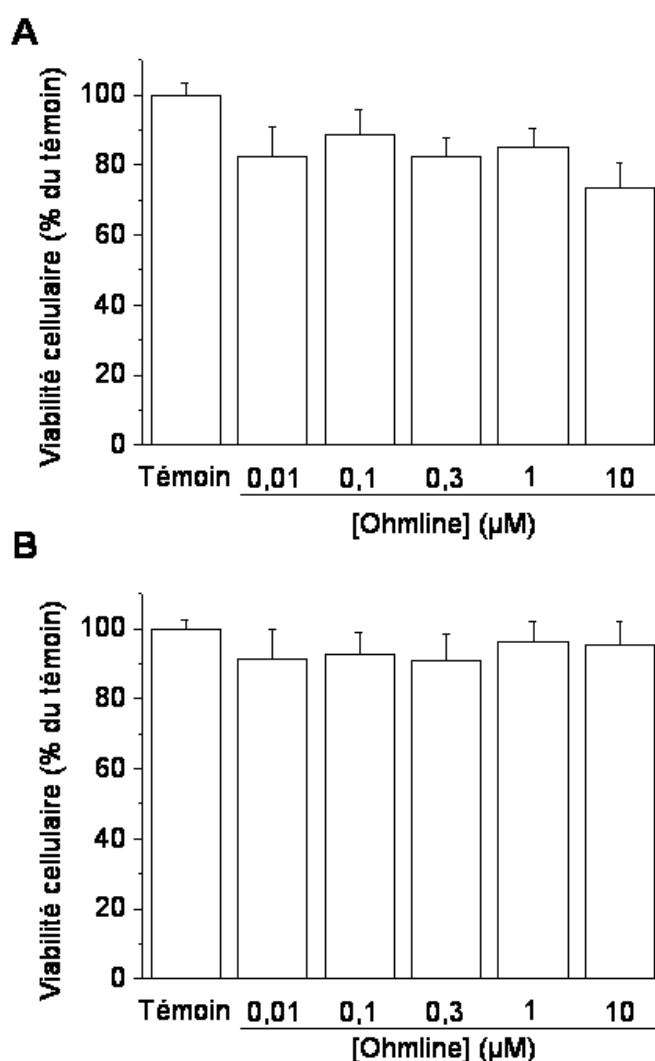
Afin de compléter cette étude de structure activité, il serait néanmoins nécessaire de tester des analogues présentant des chaînes en *sn*-1 de taille intermédiaire entre 8 et 12 atomes de carbone afin de déterminer la gamme de composés pouvant être actifs. Il pourrait également être intéressant d'évaluer les effets de plusieurs insaturations sur cette même chaîne.

Cette étude nous a permis de sélectionner un composé analogue de l'édelfosine qui répond aux différents critères que nous souhaitons atteindre. Ce composé, que l'on appellera Ohmline, est le 1-O-Hexadécyl-2-O-Méthyl-*sn*-glycéro-3-Lactose (JPH1701) et présente une activité inhibitrice de la migration cellulaire et du canal SK3 équivalente à celle de l'édelfosine mais sans les effets toxiques. Les données que nous avons obtenues sur les analogues possédant des groupements dissacharidiques nous laissent penser qu'il pourrait s'agir d'une nouvelle famille de composés inhibiteurs du canal SK3. Le nom général définissant ce groupe serait la classe des Di Ether Glycéro Disaccharides ou DEGD. Nous allons maintenant nous attacher à caractériser les mécanismes d'action de l'Ohmline.

### 3. Mécanisme d'action de l'Ohmline

#### a) L'Ohmline inhibe la migration dépendante du canal SK3

L'objectif de cette étude était de sélectionner des inhibiteurs de la migration dépendante du canal SK3 qui présentaient une toxicité réduite sur les cellules non cancéreuses. Nous avons donc mesuré l'effet de l'Ohmline sur la viabilité cellulaire des cellules cancéreuses MDA-MB-435s et nous l'avons comparé à l'effet sur les cellules non cancéreuses MCF-10A. L'Ohmline n'a aucun effet sur la viabilité cellulaire des deux lignées et ceci jusqu'à la concentration de 10  $\mu$ M (Figure 40).

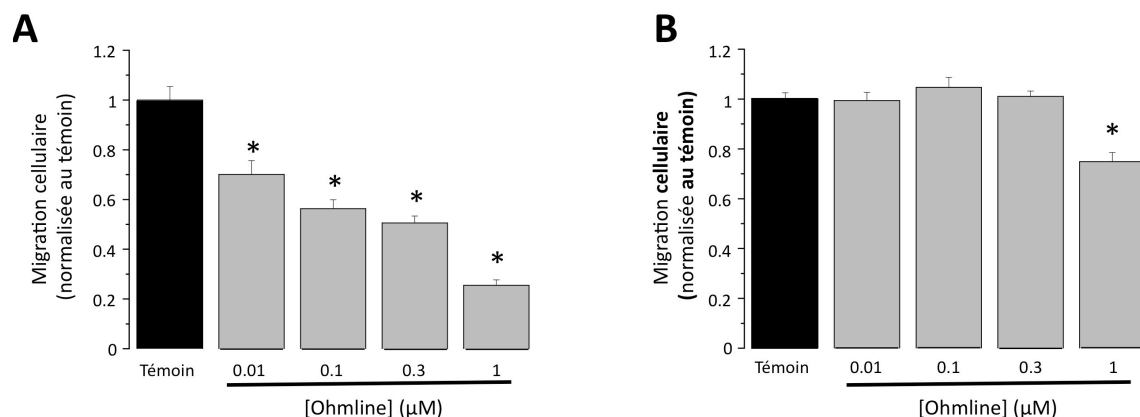


**Figure 40. Effets de l'Ohmline sur la viabilité cellulaire des cellules cancéreuses et normales.**

Activité de l'Ohmline sur les cellules épithéliales cancéreuses mammaires MDA-MB-435s (A) et sur les cellules épithéliales non cancéreuses MCF-10A (B).

L'Ohmline réduit la migration des cellules MDA-MB-435s de façon dépendante de la dose (Figure 41). Pour des concentrations de 10 nM à 300 nM, l'Ohmline n'a aucun effet sur la

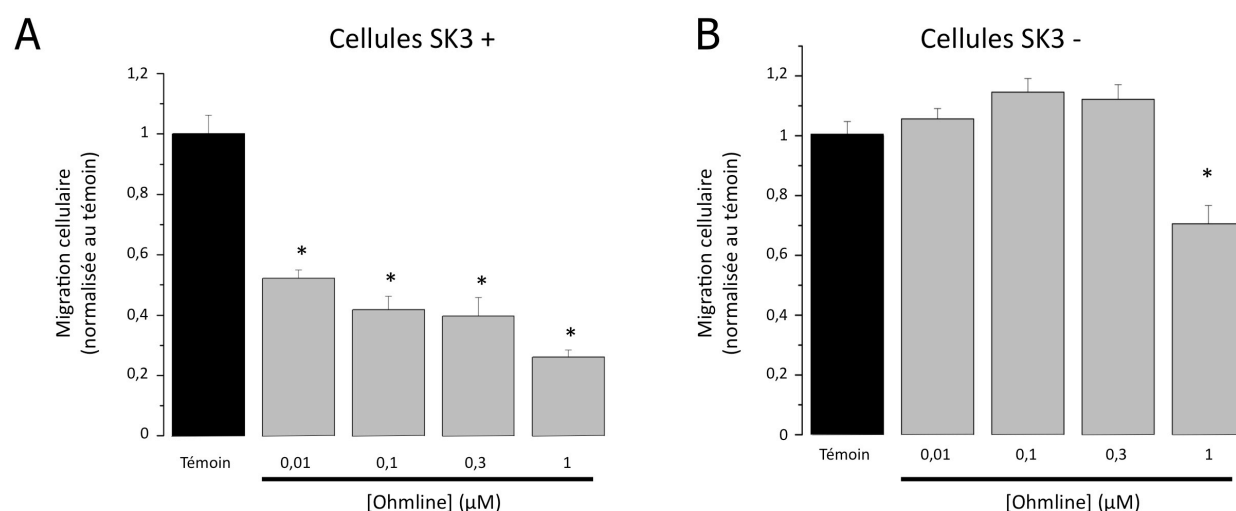
migration cellulaire des cellules non cancéreuses (Figure 41). Cependant, pour une dose de 1  $\mu\text{M}$ , nous observons une diminution significative d'environ 30 %. Ces résultats suggèrent un effet de l'Ohmline non dépendant du canal SK3.



**Figure 41. Effets de l'Ohmline sur la migration des cellules cancéreuses et des cellules normales.**

A. Effets de l'Ohmline sur la migration cellulaire des MDA-MB-435s et B) sur la migration des cellules épithéliales normales MCF-10A. \* indique une différence significative  $p < 0,05$ .

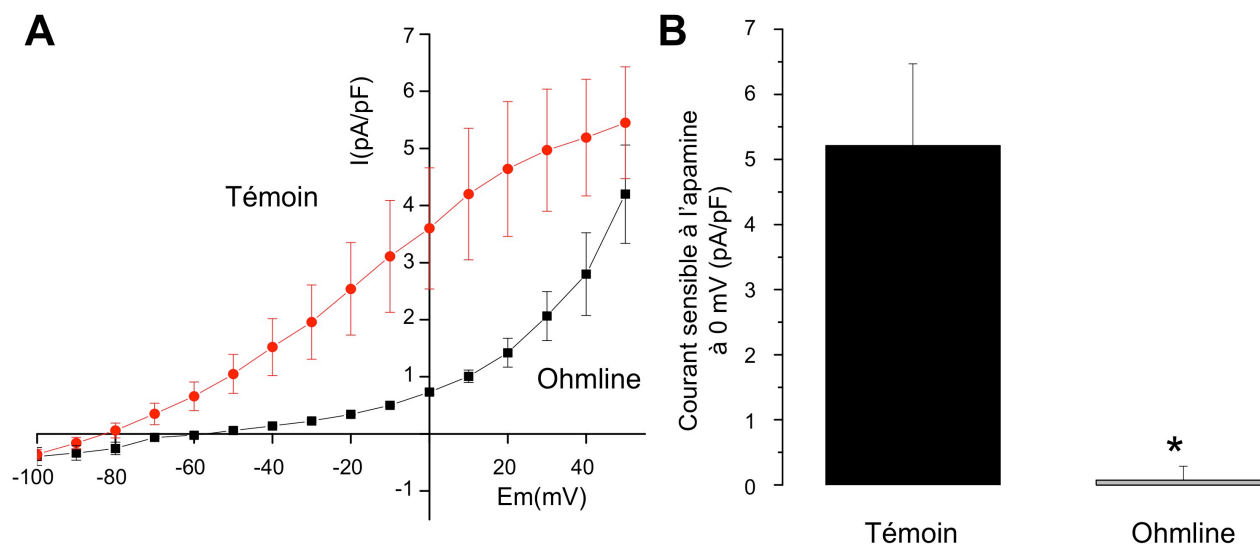
Dans le but de vérifier que l'Ohmline inhibe bien la migration dépendante du canal SK3, nous avons testé ce lipide sur la migration des cellules n'exprimant plus le canal SK3 (les cellules MDA-MB-435s shSK3 (SK3-)). Nous avons donc comparé la migration des cellules exprimant le canal ou non en présence de concentrations croissantes d'Ohmline de 10 nM à 1  $\mu\text{M}$ . Nous avons vu que l'Ohmline inhibe la migration des cellules MDA-MB-435s shRD (SK3+) et n'a aucun effet sur les MDA-MB-435s shSK3 (SK3-) excepté à 1  $\mu\text{M}$  ce qui confirme que l'Ohmline peut avoir un effet autre que sur le canal SK3 (Figure 42).



**Figure 42. Effets de l'Ohmline sur la migration dépendante du canal SK3 des cellules cancéreuses MDA-MB-435s.**

Effets de l'Ohmline sur les cellules MDA-MB-435 shRD (SK3+) (A) et sur les cellules MDA-MB-435s shSK3 (SK3-) (B). \* indique une différence significative  $p < 0,05$ .

Afin de déterminer l'activité de l'Ohmline sur le canal SK3, nous avons testé l'Ohmline sur les courants SK3 des cellules MDA-MB-435s. Par la technique de patch clamp, nous avons mesuré l'amplitude des courants des cellules MDA-MB-435s traitées ou non pendant 24 heures avec 1  $\mu$ M d'Ohmline. L'application de l'Ohmline diminue significativement l'amplitude des courants SK3 comparée aux cellules témoins (Figure 43).



**Figure 43. Effets de l'Ohmline sur le canal SK3 des MDA-MB-435s.**

A. Relation courant-voltage des cellules MDA-MB-435s témoins comparée aux cellules traitées avec l'Ohmline pendant 24 heures à 1  $\mu$ M. (N=5 et N=4 pour les cellules témoins et les cellules traitées respectivement). B. Courants sensibles à l'apamine obtenus sur des cellules témoins et des cellules traitées 24 heures avec l'Ohmline à 1  $\mu$ M. (N=4 et N=4 pour les cellules témoins et les cellules traitées respectivement). \* indique une différence significative  $p < 0,05$ .

Ceci est confirmé avec l'apamine car l'Ohmline inhibe totalement le courant sensible à l'apamine des cellules MDA-MB-435s (Figure 43).

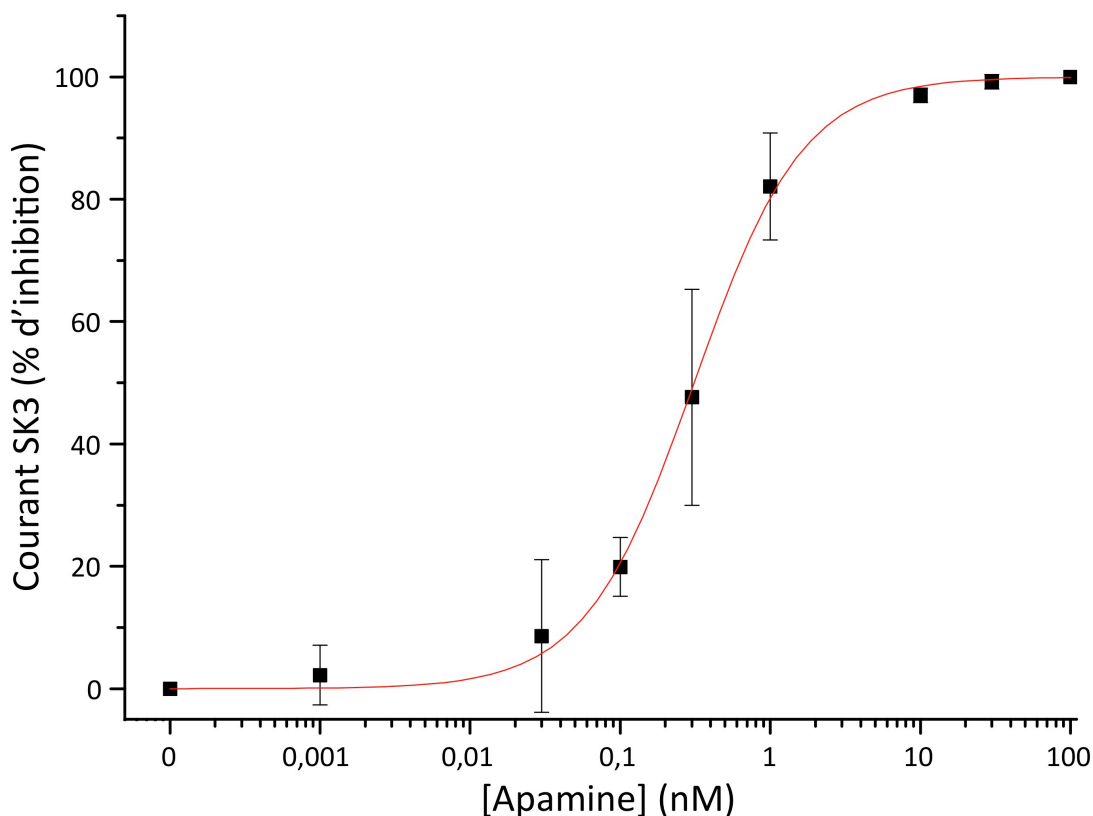
Ces résultats nous indiquent que l'activité inhibitrice de l'Ohmline sur la migration des cellules MDA-MB-435s est liée à son inhibition de l'activité du canal SK3.

#### b) L'Ohmline inhibe l'activité du canal SK3

##### (i) Sensibilité à l'apamine du canal SK3 de la lignée HEK-SK3

Afin de déterminer le mécanisme d'action de l'Ohmline sur le canal SK3, nous avons développé des cellules HEK293 exprimant de manière stable le canal SK3 et nommées HEK-SK3. Nous avons, dans un premier temps, vérifié la sensibilité à l'apamine du canal SK3 exprimé dans les cellules HEK. Par la technique de patch clamp, en configuration cellule entière, nous avons appliqué des concentrations croissantes d'apamine de 10 pM à 100 nM. Nous obtenons une inhibition dépendante de la dose avec une  $IC_{50}$  de 310 pM (Figure 44).

Cette  $IC_{50}$  est inférieure à celle rapportée dans la littérature qui est de l'ordre du nanomolaire (Wulff, H. *et al.*, 2007) mais se rapproche de celle des MDA-MB-435s.



**Figure 44. Inhibition dépendante de la dose d'apamine du canal SK3 dans les cellules HEK-SK3.**

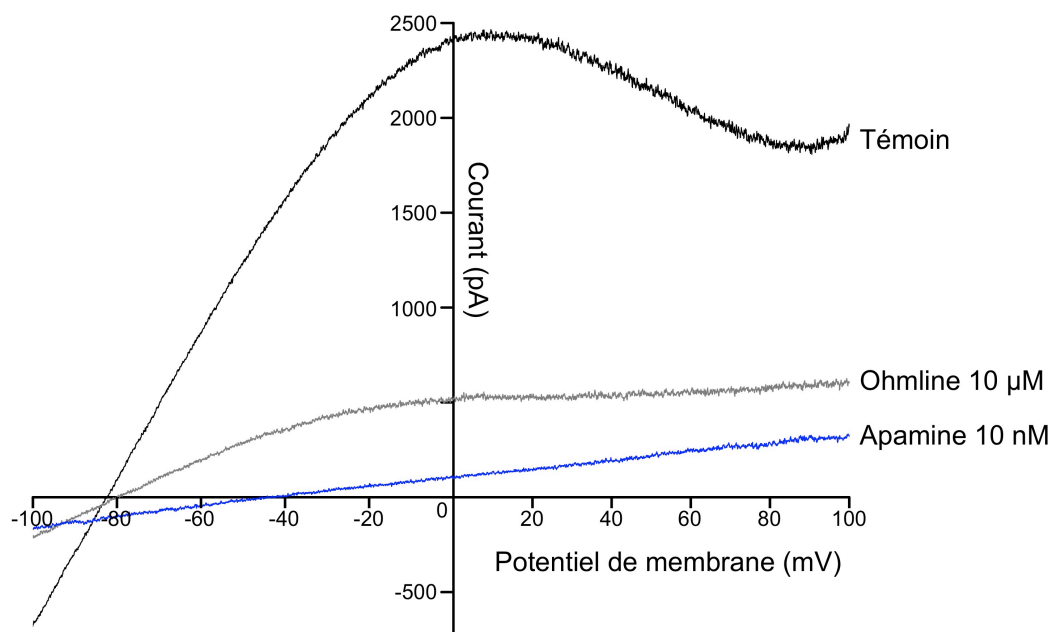
(ii) L'activité de l'Ohmlin est dépendante du temps et de la dose

Afin de déterminer si l'inhibition du canal SK3 par l'Ohmlin est dépendante du temps et de la concentration, nous avons quantifié l'effet de l'Ohmlin sur deux paramètres :

- L'amplitude du courant à 0 mV, c'est à dire à un voltage où l'on s'affranchit de la conductance chlore ( $E_{Cl^-} = 0$  mV) et le courant majoritaire est le courant SK3.
- La conductance membranaire qui représente la capacité de la cellule à laisser passer les ions au travers de sa membrane.

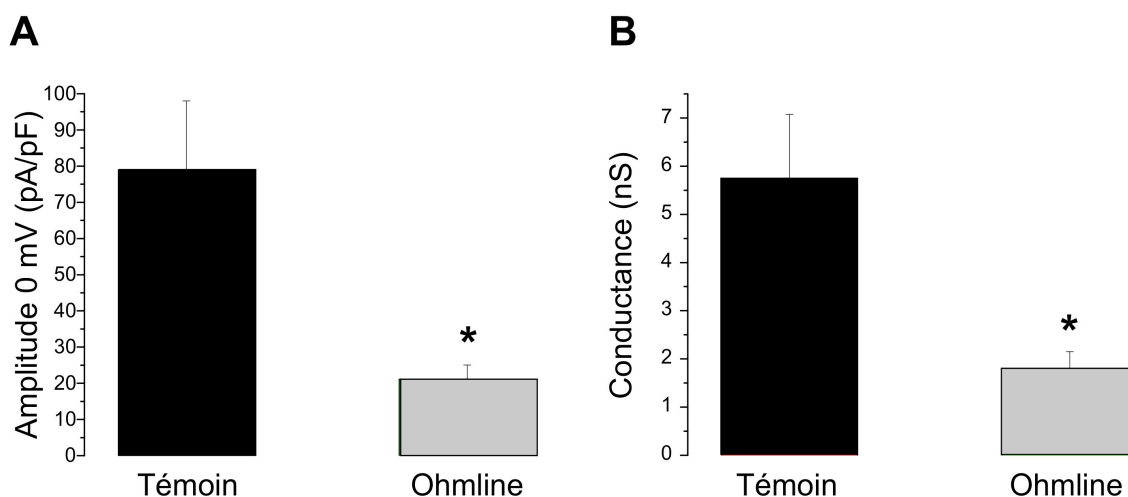
L'Ohmlin inhibe plus de 70 % du courant dans les cellules HEK-SK3 (Figure 45). L'application supplémentaire de 10 nM d'apamine bloque la totalité du courant SK3 résiduel

(Figure 45). Quel que soit le paramètre quantifié, l'effet de l'Ohmline est le même (Figure 46).



**Figure 45. Exemple de l'effet de l'Ohmline à 10  $\mu$ M en application aiguë sur les cellules HEK-SK3.**

Traces représentatives d'un courant SK3 en condition témoin, après application de 10  $\mu$ M d'Ohmline et après application supplémentaire de 10 nM d'apamine.

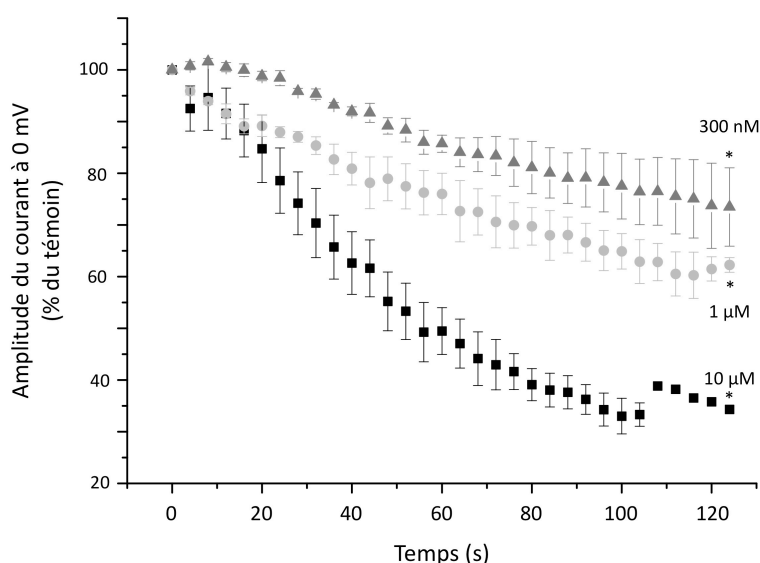


**Figure 46. Effets de l'Ohmline sur l'amplitude du courant SK3 et sur la conductance membranaire.**

A. Amplitude du courant à 0 mV avant et après application aiguë d'Ohmline à 10  $\mu$ M (N= 8). B. Conductance membranaire de la cellule avant et après application de l'Ohmline à 10  $\mu$ M (N=8). \* indique une différence significative  $p < 0,05$ .

La figure 47 montre que l'inhibition du courant SK3 est dépendante de la concentration appliquée. Lors des mêmes expériences, nous avons évalué la cinétique d'inhibition du canal SK3 par l'Ohmline. Pour cela, nous enregistrons l'évolution du courant à 0 mV au cours du

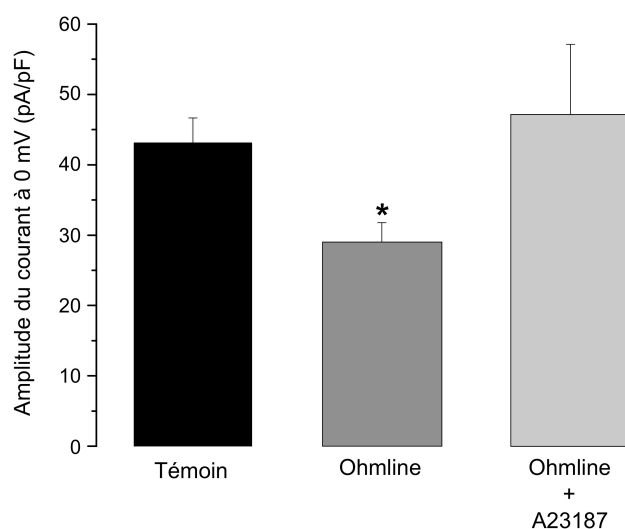
temps. Quelle que soit la concentration appliquée sur les cellules, l'Ohmline inhibe 50 % du courant après 40 secondes d'application et l'inhibition totale est observée au bout de 120 secondes (Figure 47).



**Figure 47. Inhibition du courant SK3 en fonction du temps et de la concentration d'Ohmline.**

Evolution de l'amplitude du courant à 0 mV enregistrée toutes les 4 secondes (N= 4, 3 et 3 respectivement pour les concentrations 10 µM, 1 µM et 300 nM). \* indique une différence significative  $p < 0,05$ .

Afin de déterminer si l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire pouvait diminuer l'effet de l'Ohmline, nous avons utilisé le A23187, un ionophore spécifique du  $\text{Ca}^{2+}$ . L'application de 5 µM de A23187 après l'application d'Ohmline restaure totalement l'amplitude du courant à 0 mV (Figure 48). Ce dernier résultat nous suggère que l'inhibition du canal SK3 par l'Ohmline pourrait affecter la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  du canal SK3.

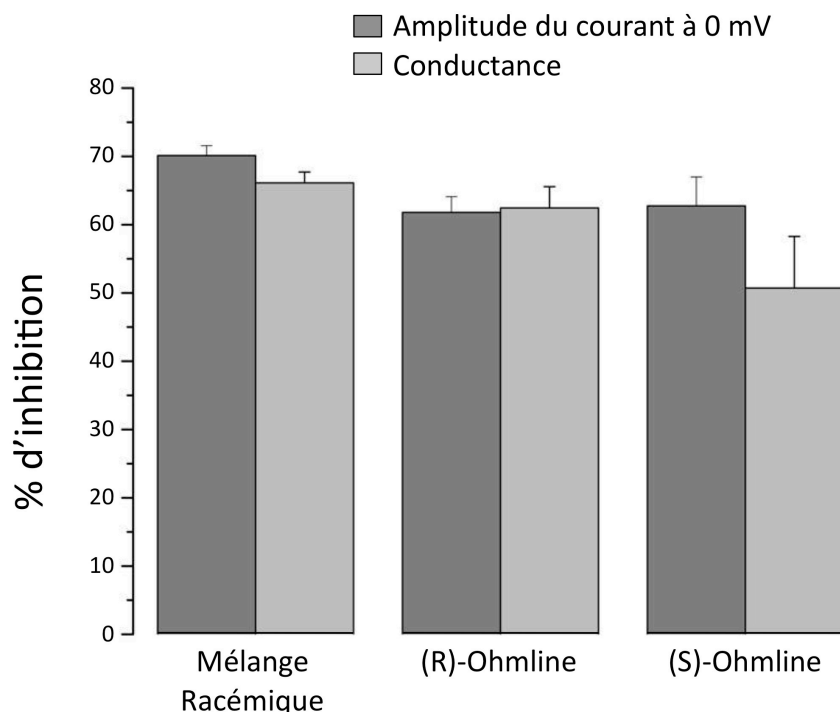


**Figure 48. Effet de l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire sur l'inhibition de l'Ohmline.** L'Ohmline est appliquée à 10 µM. Le A23187 est utilisé à 5 µM. \* indique une différence significative  $p < 0,05$ .

(iii) L'activité de l'Ohmline n'est pas dépendante de son énantiométrie

L'Ohmline présente un carbone asymétrique en *sn*-2 de son glycérol ce qui lui confère un pouvoir rotatoire de la lumière. Ce composé peut exister sous deux formes distinctes (R)-Ohmline et (S)-Ohmline. Une étude réalisée en 1994 a comparé les propriétés cytotoxiques d'un mélange racémique d'édelfosine à celles de ses énantiomères purifiés (Duclos, R. I., Jr. *et al.*, 1994). Aucune différence d'activité n'a été détectée entre la forme R, la forme S ou le mélange racémique sur les lignées de cellules leucémiques utilisées. *A contrario*, il a été montré que certaines molécules pouvaient présenter une activité différente selon l'énantiomère utilisé (Matsui, A. *et al.*, 2010). C'est ainsi que si la méthadone active le récepteur aux opioïdes en mélange racémique ou sous la forme de stéréoisomères purifiés, la forme R est 16 fois plus active que la forme S.

L'Ohmline était utilisée sous la forme d'un mélange racémique dans les expériences précédentes, nous nous sommes donc interrogés sur la stéréospécificité de l'inhibition du canal SK3 par cet éther-lipide. En comparaison avec le mélange racémique, les deux énantiomères inhibent l'activité du canal de la même manière (Figure 49). Par la suite, nous avons utilisé le mélange racémique.



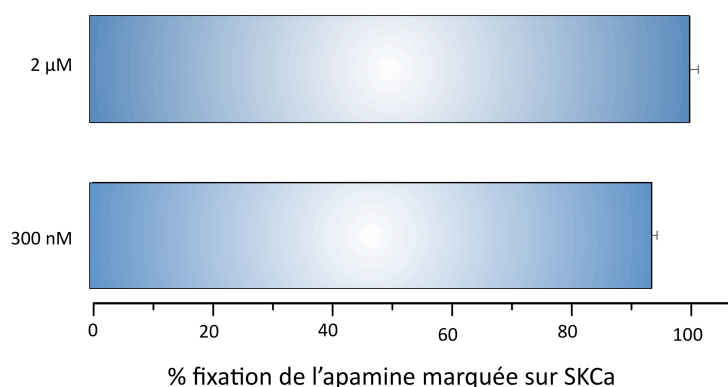
**Figure 49. Effet de la stéréospécificité de l'Ohmline sur l'inhibition du canal SK3.**

Application d'Ohmline en mélange racémique, de l'énantiomère R et de l'énantiomère S à 10  $\mu$ M (N=7, 4 et 4 pour les différentes conditions).



#### (iv) Site de fixation de l'Ohmline

Les résultats obtenus avec le A23187 indiquent que l'Ohmline ne semble pas « boucher » le pore du canal car une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire permet de restaurer le courant initial. Des expériences de déplacement de l'apamine radiomarquée ont été réalisées par la CEREP (Celles L'Evescault, 86). Il s'agit d'évaluer la capacité d'un composé à déplacer l'apamine marquée avec de l'iode radioactive ( $^{125}\text{I}$ ) de son site de fixation des canaux SKCa. L'apamine est un bloqueur du pore des canaux SKCa et si un autre composé se fixe sur le même site, il apparaîtra une compétition entre ces deux molécules. La compétition entraînera une diminution de la fixation du ligand spécifique du canal. Nous avons testé deux concentrations d'Ohmline, 300 nM et 2  $\mu\text{M}$ , sur des préparations membranaires exprimant les canaux SKCa. L'Ohmline ne déplace pas l'apamine de son site de fixation quelle que soit la concentration utilisée, ce qui indique que l'Ohmline ne se fixe pas au niveau du pore (Figure 50).



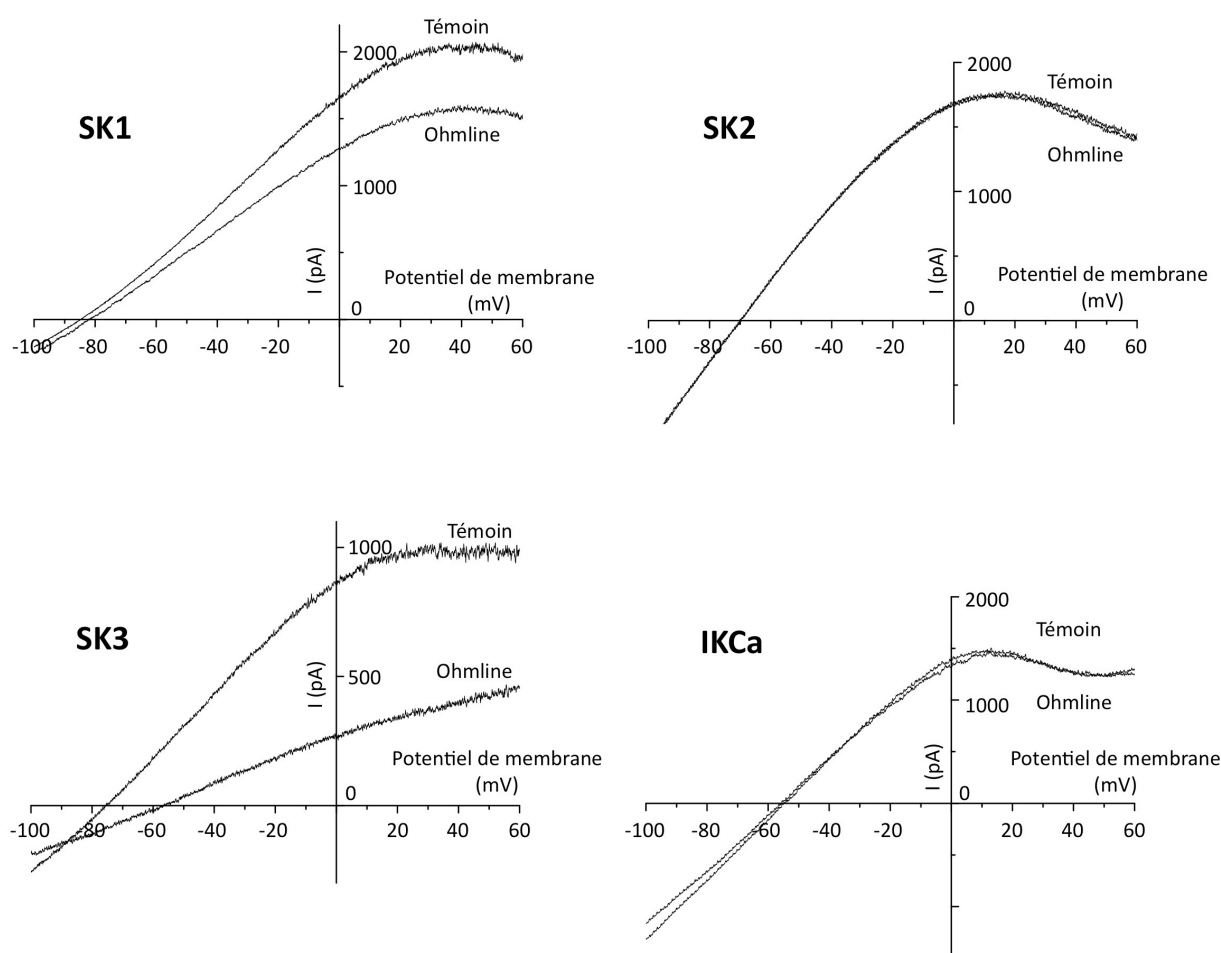
**Figure 50. Effet de l'Ohmline sur la fixation de l'apamine ( $^{125}\text{I}$ ).**

Ce résultat suggère que l'Ohmline s'incorpore dans la membrane comme le font classiquement les éther-lipides pour obtenir leurs effets. Afin d'éclaircir ce mécanisme, il serait nécessaire de réaliser des expériences de patch-clamp en configuration inside-out ou bien outside-out pour montrer que l'Ohmline s'incorpore préférentiellement dans un feuillet. Il pourrait également être envisagé de réaliser des expériences de mutagenèse dirigée afin d'établir quelles sont les parties et les séquences en acides aminés nécessaires à l'inhibition du canal SK3 par l'Ohmline. Ces expériences permettraient de définir si il existe un site de fixation spécifique pour l'Ohmline sur le canal ou bien si l'effet inhibiteur est induit par une perturbation de l'environnement membranaire du canal.

### c) Sélectivité de l'Ohmline envers les KCa

Afin d'évaluer la sélectivité de l'Ohmline vis-à-vis du canal SK3, nous avons testé ses effets sur les canaux SK1, SK2 et IKCa. Pour cela nous avons développé des lignées cellulaires HEK exprimant les différents canaux.

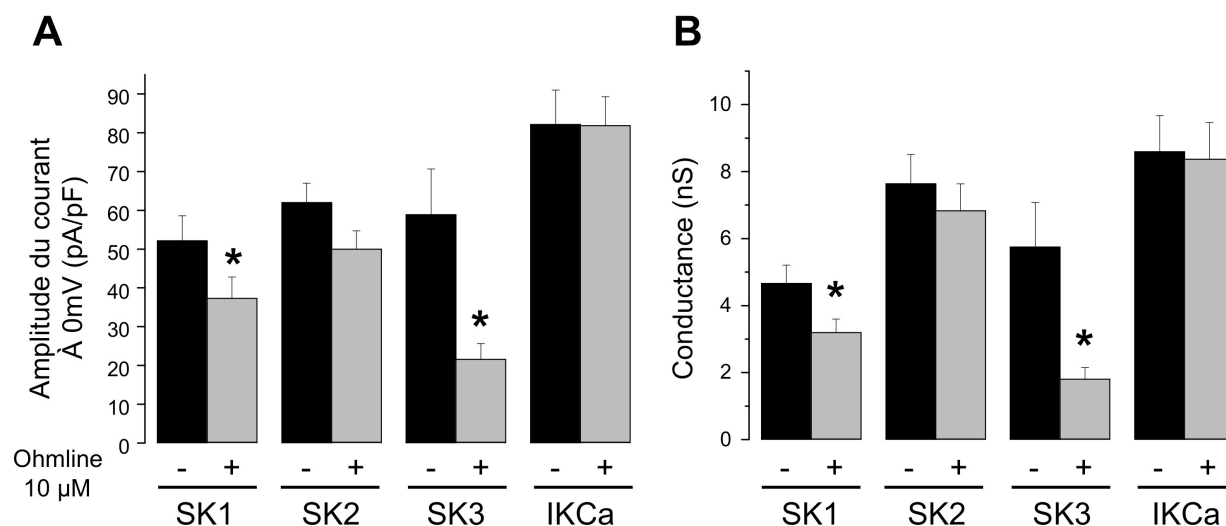
La figure 51 présente des traces représentatives de courants enregistrés dans les différents types cellulaires (HEK-SK1, HEK-SK2, HEK-SK3 et HEK-IKCa) en condition contrôle et après application de 10  $\mu$ M d'Ohmline. Après avoir atteint l'état stable suite à l'application de l'Ohmline, nous avons appliqué 10 nM d'apamine pour les cellules HEK-SK1 et HEK-SK3, 10 mM de TEA pour les HEK-SK2 (le canal utilisé n'est pas sensible à l'apamine) et 1  $\mu$ M de clotrimazole pour les HEK-IKCa pour inhiber la totalité du courant résiduel.



**Figure 51. Courants représentatifs enregistrés dans les cellules HEK293 exprimant les différents canaux SKCa et IKCa avant et après applications de l'Ohmline.**

L'Ohmline n'affecte pas l'activité du canal IKCa ni celle du canal SK2 à la concentration utilisée. Par contre, cet éther-lipide inhibe fortement SK3 et à moindre degré SK1 (Figure 51). Quel que soit le paramètre mesuré (amplitude à 0 mV ou conductance membranaire), l'effet

de l'Ohmline est identique (Figure 52). A notre connaissance, il s'agit du premier composé inhibiteur des SKCa présentant ce profil pharmacologique (SK3 > SK1 et pas d'effet sur SK2 et IKCa, sous réserve de la confirmation de l'effet sur le canal SK2).



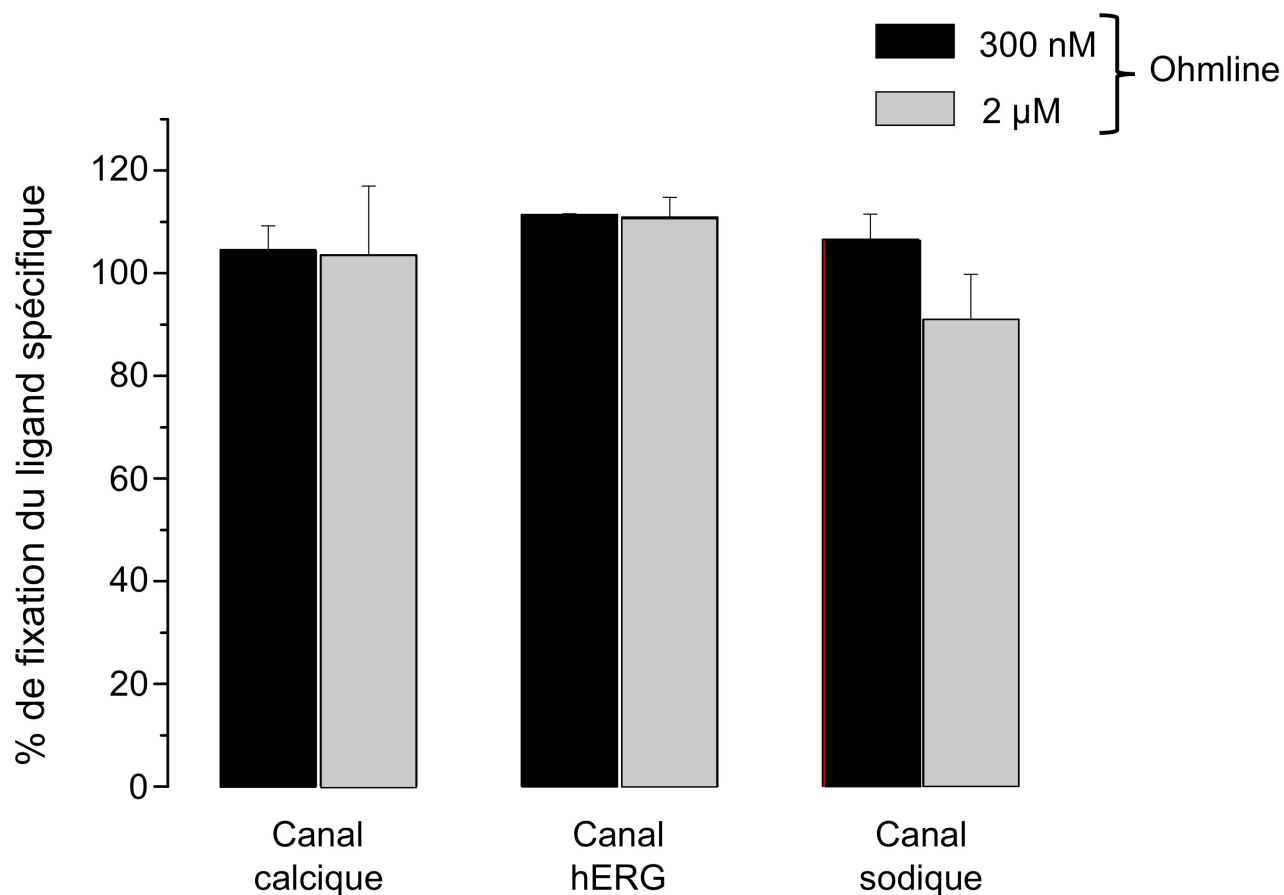
**Figure 52. Effets de l'Ohmline sur l'amplitude et la conductance des courants SK1, SK2, SK3 et IKCa.**

Effets de l'Ohmline sur l'amplitude du courant (A) et sur la conductance membranaire (B). \* indique une différence significative  $p < 0,05$ .

#### (i) Sélectivité de l'Ohmline envers d'autres canaux

Nous avons évalué la possibilité que l'Ohmline interagisse avec d'autres canaux ioniques que les KCa. Des expériences utilisant la technique du déplacement de ligands spécifiques radiomarqués ont été conduites par la CEREP. L'Ohmline a été testée sur le canal calcique dépendant du voltage de type L (sur le site à dihydropyridine), sur le canal hERG (human Ether-à-go-go Related Gene) et sur le canal sodique dépendant du voltage (sur le site 2). Les ligands spécifiques utilisés pour ce test sont les suivants : la nitrendipine pour le canal calcique, l'astémizole pour le canal hERG et la batrachotoxine pour le canal sodique. Le canal calcique et le canal sodique ont été préparés à partir d'extraits membranaires du cortex de rat et le hERG est issu de préparations membranaires de cellules HEK293 exprimant ce canal. Comme pour l'expérimentation du déplacement d'apamine, nous avons testé l'Ohmline à deux concentrations, 200 nM et 3 µM. L'Ohmline n'affecte pas la fixation des ligands sur les trois canaux (Figure 53). Ceci démontre que l'Ohmline n'interagit pas avec les sites de fixation de ces inhibiteurs sur les canaux testés. Cependant, ces résultats n'excluent pas la

possibilité que ce composé interagisse avec un autre site de ces canaux et affecte leur activité. Les expériences permettant de valider définitivement une absence d'effet seraient une étude de fonctionnalité par patch clamp.



**Figure 53. Effets de l'Ohmline sur la fixation des ligands spécifiques des canaux calciques de type L, hERG et canal sodique dépendant du voltage.**

Les résultats représentent la moyenne de deux expériences  $\pm$  SEM.

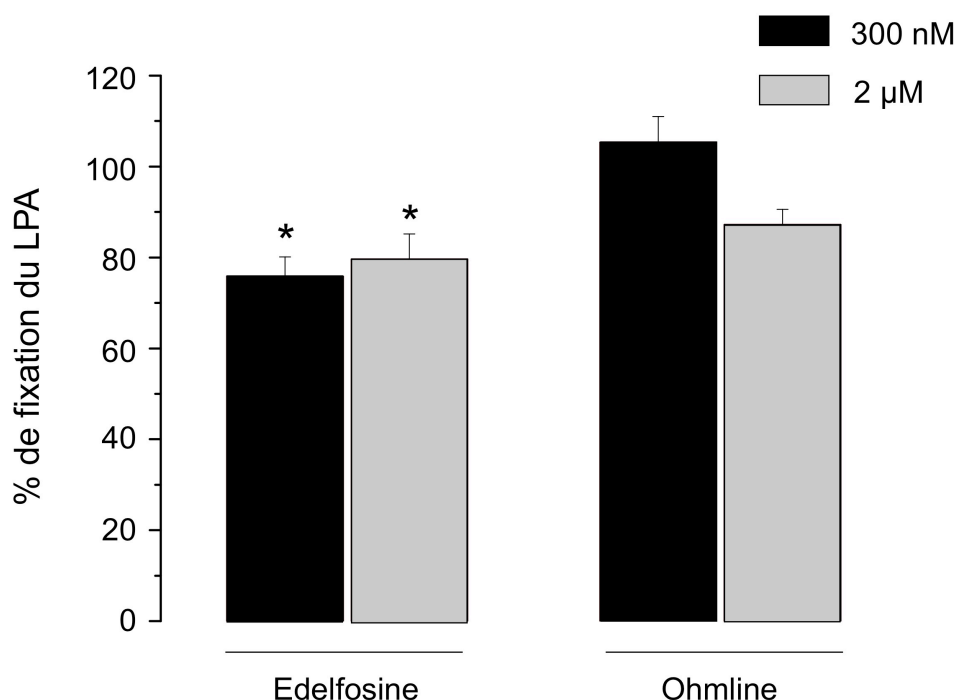
#### d) Effets de l'Ohmline sur les autres cibles de l'édelfosine

(i) Activités de l'Ohmline sur le récepteur à l'acide lysophosphatidique et sur le récepteur au PAF

L'Ohmline présente une structure très proche de celles de l'acide lysophosphatidique (LPA) et du PAF. L'Ohmline pourrait, comme le fait l'édelfosine, augmenter la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire en se fixant sur le récepteur au PAF (Alonso, M. T. *et al.*, 1997). Ces similarités structurales nous ont conduits à évaluer les effets de l'Ohmline sur les récepteurs

spécifiques au LPA et au PAF par des expériences de déplacement de ligand réalisées à la CEREP.

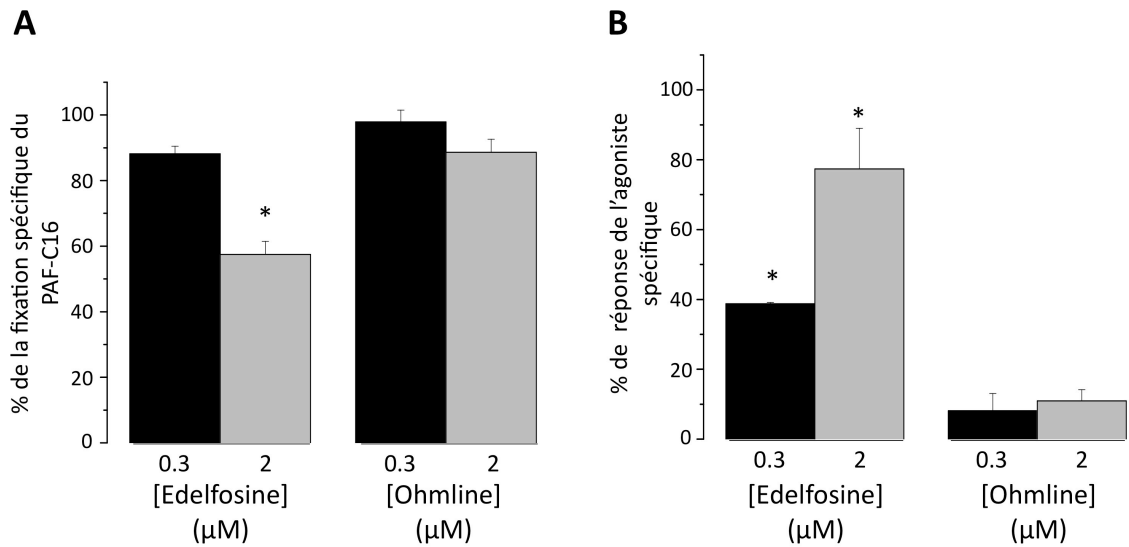
Contrairement à l'édelfosine, dans les expériences de déplacement de ligand spécifique du récepteur au LPA, l'Ohmline n'affecte pas la fixation du LPA à son récepteur (Figure 54). Ces résultats suggèrent que l'Ohmline ne se fixe pas sur le récepteur au LPA contrairement à l'édelfosine.



**Figure 54. Effets de l'édelfosine et de l'Ohmline sur la fixation de l'acide lysophosphatidique à son récepteur.**

Les résultats représentent la moyenne de deux expériences  $\pm$  SEM. \* indique une différence significative  $p < 0,05$ .

Nous avons par la suite testé si l'Ohmline pouvait se fixer sur le récepteur du PAF et augmenter le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. L'édelfosine est capable d'interagir avec le récepteur au PAF et de plus, elle est capable de produire une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante de la concentration appliquée (Figure 55). A l'opposé, l'Ohmline n'a aucun effet sur la fixation du PAF sur son récepteur ni sur l'activation de son récepteur (Figure 55). L'Ohmline ne se fixe pas sur le récepteur au PAF.

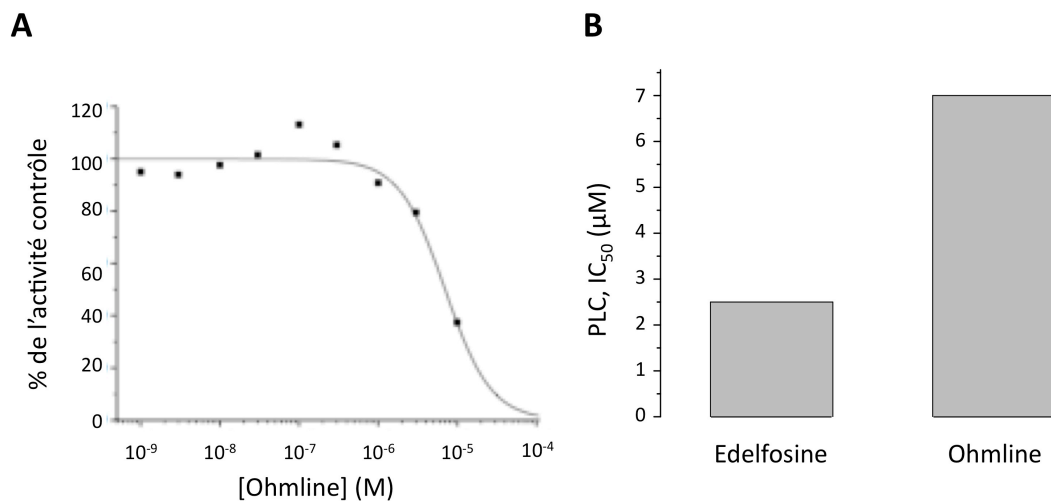


**Figure 55. Effets de l'édelfosine et de l'Ohmline sur la fixation du PAF à son récepteur et sur l'activation de ce récepteur.**

A. Effets de l'édelfosine et de l'Ohmline sur la fixation spécifique du PAF à son récepteur. B. Effets de l'édelfosine et de l'Ohmline sur l'activation du récepteur au PAF. \* indique une différence significative  $p < 0,05$ .

(i) Activités de l'Ohmline sur la phospholipase C et sur les PKCs

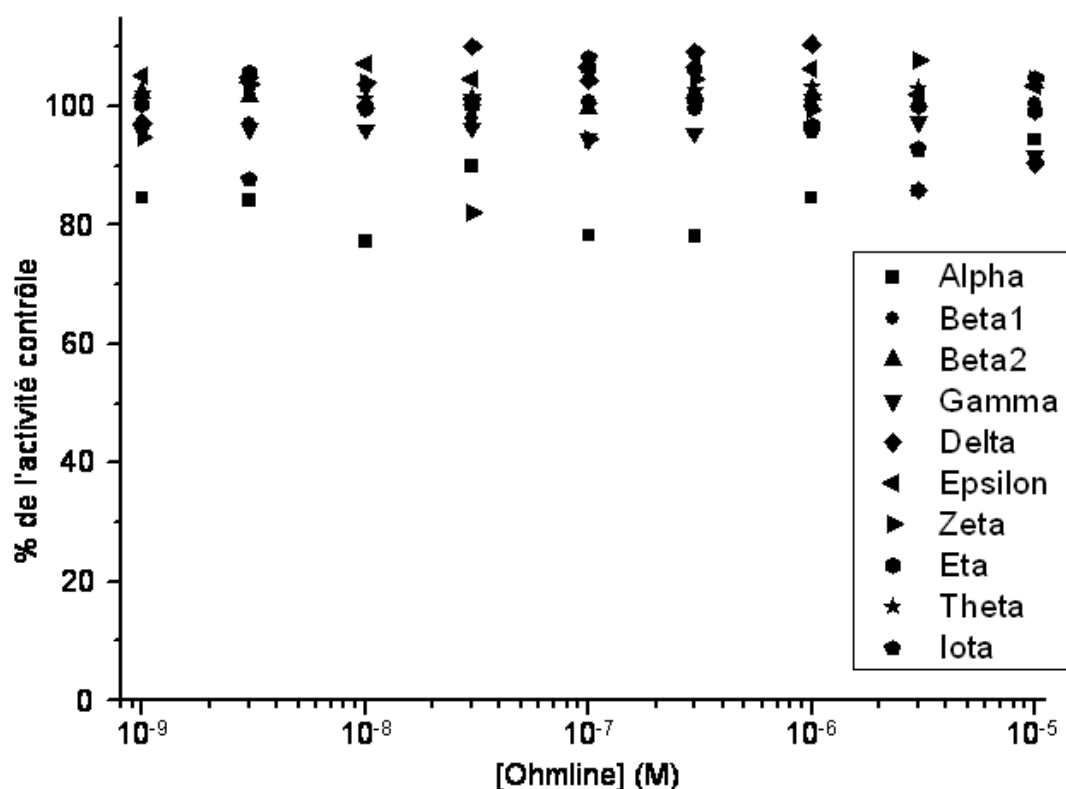
Il a été décrit que l'édelfosine pouvait moduler l'activité des PKCs (résultats variables en fonction des travaux cités précédemment) et de la phospholipase C. Ces activités pourraient d'ailleurs participer aux activités cytotoxiques de ce composé (Gajate, C. *et al.*, 2002). Par des mesures d'activité enzymatique libérant un composé fluorogénique, nous avons mesuré l'effet de l'Ohmline sur la PLC et sur les dix familles de PKC existantes (CEREP). L'Ohmline est capable d'inhiber l'activité de la PLC ( $IC_{50} = 7 \mu M$ ) mais de manière moins importante que l'édelfosine ( $IC_{50} = 2,5 \mu M$ ) (Figure 56).



**Figure 56. Effets de l'Ohmline sur l'activité de la phospholipase C.**

A. Inhibition de l'activité de la PLC dépendante de la concentration d'Ohmline. B. Comparaison des  $IC_{50}$  de l'édelfosine et de l'Ohmline pour la PLC. L'édelfosine est utilisée en tant qu'inhibiteur de référence.

L'Ohmline n'a cependant aucun effet sur les PKCs contrairement à l'édelfosine (Figure 57).



**Figure 57. Effets de l'Ohmline sur l'activité des 10 familles de PKCs.**

#### e) Toxicité et génotoxicité de l'Ohmline

Avant d'évaluer l'Ohmline dans les modèles murins de cancer métastatique, nous avons évalué la toxicité bactérienne et la génotoxicité de l'Ohmline (CEREP). Un bilan des résultats est présenté dans le tableau 9.

Toxicité bactérienne		
His-Reverted Salmonella typhimurium Souche TA98		Pas d'effet
His-Reverted Salmonella typhimurium Souche TA100		Toxique à 10 $\mu$ M
His-Reverted Salmonella typhimurium Souche TA1535		Toxique à 25 $\mu$ M
Test de Ames		
Souche TA98	- S9	Pas d'effet
	+S9	Pas d'effet
Souche TA100	- S9	Pas d'effet
	+S9	Pas d'effet
Souche TA1535	- S9	Pas d'effet
	+S9	Pas d'effet
Test des micronoyaux		
CHO-K1	- S9	Faible effet à 100 $\mu$ M
	+S9	Pas d'effet

**Tableau 9. Evaluation de la génotoxicité de l'Ohmline.**

S9 : extrait de foie de rat pour augmenter le métabolisme des composés lors de l'évaluation.

La toxicité bactérienne a été évaluée sur trois souches de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100 et TA1535). L'Ohmline ne présente pas de toxicité sur ces différentes souches pour des concentrations inférieures à 10  $\mu$ M. Le test de Ames ne montre pas de propriété mutagène de l'Ohmline sur ces mêmes souches bactériennes. L'utilisation d'Ohmline sur les cellules CHO-K1 dans un test des micronoyaux ne présente qu'une faible réponse pour des concentrations supérieures à 100  $\mu$ M et l'utilisation du mix S9 (un extrait de foie de rat utilisé pour stimuler le métabolisme) entraîne la disparition de cet effet mineur. Ces données nous indiquent que l'Ohmline ne présente pas de cytotoxicité ou de génotoxicité à des concentrations inférieures à 100  $\mu$ M.

## C. Discussion

L'étude de la relation entre la structure et l'activité de l'édelfosine nous a permis de mettre en évidence les parties de sa structure importante pour obtenir une inhibition de la migration cellulaire dépendante du canal SK3. Une étude similaire a été conduite en 1997, par l'équipe de Mollinedo, afin de déterminer les éléments structuraux nécessaires à l'induction de l'apoptose de cellules leucémiques (Mollinedo, F. *et al.*, 1997). Ces travaux ont montrés que l'induction de l'apoptose était inhibée dès que l'on remplace le groupement méthoxy en *sn*-2 ou le groupement phosphocholine en *sn*-3 de l'édelfosine. Concernant la chaîne carbonée en *sn*-1, elle peut être réduite de 2 atomes de carbone ou posséder des insaturations sans altérer l'induction de l'apoptose. Il existe donc certains pré requis pour l'inhibition de SK3 et de la migration cellulaire qui sont identiques à ceux nécessaires pour l'induction de l'apoptose : la chaîne en *sn*-1 et le groupement méthoxy. Comme nous l'avons observé pour la substitution du *sn*-2, les modifications peuvent entraîner une inversion totale de l'activité sur le canal SK3 : la substitution du groupe méthoxy par un groupement  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$  conduit à l'activation de la migration. En fonction du groupement situé en *sn*-3, phosphocholine ou lactose, il sera possible de choisir l'activité inhibitrice. Dans le cas de l'apoptose, la conservation de la phosphocholine est indispensable pour induire le phénomène et son remplacement par une PE ou une PS inhibe l'effet. La substitution de la phosphocholine par un groupement disaccharidique va ainsi permettre une sélectivité de fonctions : il est peu probable que les analogues que nous avons testés induisent l'apoptose. Par ailleurs, il a été montré que l'édelfosine ne provoque pas l'apoptose des MDA-MB-435s à 1  $\mu$ M (Potier, M. *et al.*, 2011). Cette différence peut expliquer en partie la disparition de toxicité sur la viabilité cellulaire à 24 heures de nos analogues présentant les différents groupes saccharidiques.



Cette étude nous a également permis de sélectionner l'Ohmline comme étant la molécule la plus active sur le canal SK3 et sur la migration cellulaire. L'Ohmline appartient à la classe des Di Ether Glycéro Disaccharides ou DEGD qui pourrait devenir une nouvelle famille d'inhibiteurs du canal SK3. L'Ohmline a présenté une propriété inhibitrice de la migration dépendante du canal SK3 équivalente à celle de l'édelfosine. De plus, nous avons montré que ce composé n'avait aucun effet jusqu'à 10  $\mu\text{M}$  sur la viabilité des cellules non cancéreuses et n'affectait pas la migration de ces cellules jusqu'à 300 nM.

Jusqu'à présent, deux grandes classes d'inhibiteurs des canaux SKCa étaient connues : les toxines peptidiques et les petites molécules synthétiques (Wulff, H. *et al.*, 2007). Parmi les toxines, l'apamine, qui provient du venin d'abeille, est la mieux connue et la plus utilisée. Cette toxine n'est pas sélective d'une isoforme de SKCa mais elle inhibe préférentiellement SK2 puis SK3 et SK1 (Kohler, M. *et al.*, 1996; Nolting, A. *et al.*, 2007). Parmi cette première famille d'inhibiteurs des SKCa, toutes les molécules testées ne permettent pas de différencier l'activité des différentes isoformes de SKCa excepté le Lei-Dab (Shakkottai, V. G. *et al.*, 2001). Cette molécule, dérivée de la leïurotoxine, est 650 fois plus active sur SK2 que sur SK1 et SK3. Concernant la famille des petites molécules synthétiques, le déqualinium et l'UCL1684 inhibent les canaux SKCa avec la même affinité que l'apamine (Campos Rosa, J. *et al.*, 2000). Différents analogues de ces composés sont également des inhibiteurs des SKCa. Un autre inhibiteur récent des SKCa et appartenant aux petites molécules synthétiques, le NS8593, ne déplace pas la fixation de l'apamine contrairement à tous les autres composés cités précédemment (Strobaek, D. *et al.*, 2006). Le NS8593 a été montré pour inhiber les canaux SKCa en diminuant leur sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$ . Parmi ces composants, aucun ne permet de différencier les SKCa. L'Ohmline est un composé présentant une structure et une sélectivité différentes aux inhibiteurs actuellement connus de ce canal. Cette molécule inhibe le canal SK3 de manière plus importante que le canal SK1 et n'a pas d'effet sur SK2 et IKCa. L'Ohmline est le premier bloqueur qui permet de distinguer SK2 de SK1 et SK3. Cette propriété pourrait permettre à l'Ohmline de devenir un composé de référence pour évaluer les fonctions de SK3 dans les tissus périphériques où SK1 n'est pas exprimé.

L'Ohmline ne déplace pas la fixation de l'apamine, elle doit donc agir sur un site différent. De plus, nous avons montré que son effet inhibiteur disparaît quand le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire augmente ce qui suggère que l'Ohmline modifie la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  du canal SK3. La structure lipidique de ce composé pourrait lui permettre de s'incorporer dans la membrane où il pourra agir sur le canal SK3 comme l'édelfosine le fait pour recruter les récepteurs

FAS/CD95 (Gajate, C. *et al.*, 2009). Dans les cellules endothéliales, le canal SK3 a été mis en évidence dans des domaines lipidiques particuliers, les cavéoles (Absi, M. *et al.*, 2007). La localisation du canal SK3 n'ayant pas encore été déterminée dans les cellules cancéreuses, il est possible que l'Ohmlin agisse sur le canal en modifiant la composition membranaire de ces domaines lipidiques. Par ailleurs, l'Ohmlin pourrait inhiber le canal SK3 en modifiant les propriétés physiques de la membrane comme cela a déjà été montré pour les canaux potassiques à deux domaines pores (TREK et TRAAK) (Maingret, F. *et al.*, 2000; Patel, A. J. *et al.*, 2001).

Le but de cette étude était de sélectionner des analogues de l'édelfosine aussi efficaces que l'édelfosine sur l'activité du canal SK3 et sur la migration cellulaire mais présentant moins de toxicité. En effet, l'utilisation de l'édelfosine en clinique a été arrêtée suite à l'apparition d'effets secondaires (Gajate, C. *et al.*, 2002). Nous avons observé que l'édelfosine présentait une forte toxicité sur des cellules non cancéreuses. D'autre part, il est admis que certains effets toxiques des éther-lipides sont liés à leur similarité structurale avec le PAF et leur capacité à activer son récepteur. En effet, si les éther-lipides sont capables de se lier au récepteur du PAF, cela pourrait entraîner l'apparition de thrombus dans le système vasculaire lors de leur injection intraveineuse comme cela a déjà été montré pour le PAF (Bourgain, R. H. *et al.*, 1992). Comme nous l'avons montré l'Ohmlin ne se fixe pas à ce récepteur, il semble que cette molécule sera donc moins susceptible de favoriser des phénomènes d'agrégation plaquettaire, ce qui est une condition préalable pour éviter la formation de thromboses lors de son utilisation *in vivo*. De même, l'Ohmlin ne déplace pas la fixation du LPA de son récepteur. Ces données nous suggèrent que ce composé possède moins d'effets non spécifiques que l'édelfosine. Cette différence d'activité avait déjà été montrée pour des éther-lipides présentant des groupes monosaccharidiques en *sn-3* fixés par une liaison contenant un soufre (Guivisdalsky, P. N. *et al.*, 1990). Il a été montré que la stéréochimie du carbone anomérique du sucre pouvait modifier l'activité du composé : l'anomère alpha du glycolipide est plus efficace que l'anomère beta (Guivisdalsky, P. N. *et al.*, 1990). Nous avons montré en substituant le lactose par d'autres disaccharides (maltose ou mélibiose) présentant des modifications du type de liaison et également de la série de l'ose que l'activité inhibitrice est diminuée. Il peut donc exister une spécificité de l'Ohmlin vis-à-vis de SK3 dépendante du type de dissaccharide. D'autre part, certains composés présentant un carbone asymétrique peuvent avoir une activité différente selon leur conformation (Matsui, A. *et al.*, 2010), nous avons évalué si l'activité de l'Ohmlin, qui possède un carbone asymétrique en position *sn-2*

du glycérol, était dépendante de sa stéréochimie. Nous avons montré que les deux stéréoisomères produisaient la même inhibition sur le canal. Ceci est concordant avec les résultats obtenus sur l'activité d'induction de l'apoptose par l'édelfosine qui est aussi efficace quelle que soit la conformation *R* ou *S* (Duclos, R. I., Jr. *et al.*, 1994; Mollinedo, F. *et al.*, 1997).

Il est également connu que l'édelfosine peut exercer certaines de ses activités biologiques en inhibant l'activité de certaines enzymes comme les protéines kinases C ou la phospholipase C (Gajate, C. *et al.*, 2002; van Blitterswijk, W. J. *et al.*, 2008). Nous avons montré que l'Ohmline n'avait aucun effet sur les PKCs et qu'elle interagissait avec la PLC pour des concentrations plus élevées que celle de l'édelfosine. Ces résultats montrent que l'Ohmline semble plus sélective que l'édelfosine, ceci pourrait être une explication de l'absence de toxicité de ce composé sur les cellules non cancéreuses.

L'Ohmline ne présente pas de génotoxicité pour des concentrations inférieures à 100  $\mu$ M. Comme l'inhibition par l'Ohmline de la migration dépendante de SK3 est obtenue à des concentrations bien plus faibles ( $IC_{50} = 300$  nM), ceci indique que ce composé pourrait être utilisé *in vivo* sans induire de toxicité majeure.

## II. L'Ohmline : une nouvelle molécule anti-métastatique

Les résultats obtenus sur l'Ohmline *in vitro* nous ont incité à évaluer l'activité de ce composé sur le développement tumoral *in vivo* et en particulier sur l'évolution de la tumeur primaire et sur la formation de métastases. Nous avons aussi évalué l'effet de l'édelfosine car ce lipide, malgré ses effets toxiques, n'a jamais été testé sur le développement des métastases.

Nous avons développé deux modèles murins de cancers métastatiques :

- (i) un modèle de xénogreffe orthotopique pour lequel les métastases sont développées en parallèle du développement d'une tumeur primaire
- (ii) un modèle dit de « métastases expérimentales » pour lequel les tissus sont colonisés par les cellules cancéreuses injectées directement dans la circulation veineuse (pas de tumeur primaire).

Afin de suivre, *in vivo*, le développement des tumeurs primaires et des métastases, nous avons utilisé des cellules cancéreuses mammaires qui ont été modifiées génétiquement pour exprimer la luciférase. Il s'agit des mêmes cellules que celles utilisées pour les expériences de migration (MDA-MB-435 shRD, SK3+).

Les expériences ont été réalisées sur la plate-forme *in vivo* de l'Axe "Valorisation des produits de la mer en cancérologie" du Cancéropôle Grand-Ouest en collaboration avec le Dr Séverinne Marionneau-Lambot et Mr Thibault Oullier.

## A. L'Ohmlin et l'édelfosine réduisent le développement des métastases

### 1. Etude de toxicité

Avant d'évaluer les effets de l'Ohmlin et de l'édelfosine sur le développement tumoral, nous avons testé si ces composés présentaient une toxicité chez les souris. Dans ce but, nous avons utilisé le protocole décrit dans la section Méthodologie (page 141).

Nous avons utilisé, pour réaliser cette expérience, 27 souris réparties en 3 groupes :

- Groupe 1O : 9 souris recevaient des injections intraveineuses d'Ohmlin à 0,25 mg/kg, 5 fois par semaine pendant 2 semaines
- Groupe 2O : 9 souris recevaient des injections intraveineuses d'Ohmlin à 2,5 mg/kg, 5 fois par semaine pendant 2 semaines
- Groupe 3O : 9 souris recevaient des injections intraveineuses d'Ohmlin à 15 mg/kg, 5 fois par semaine pendant 2 semaines.

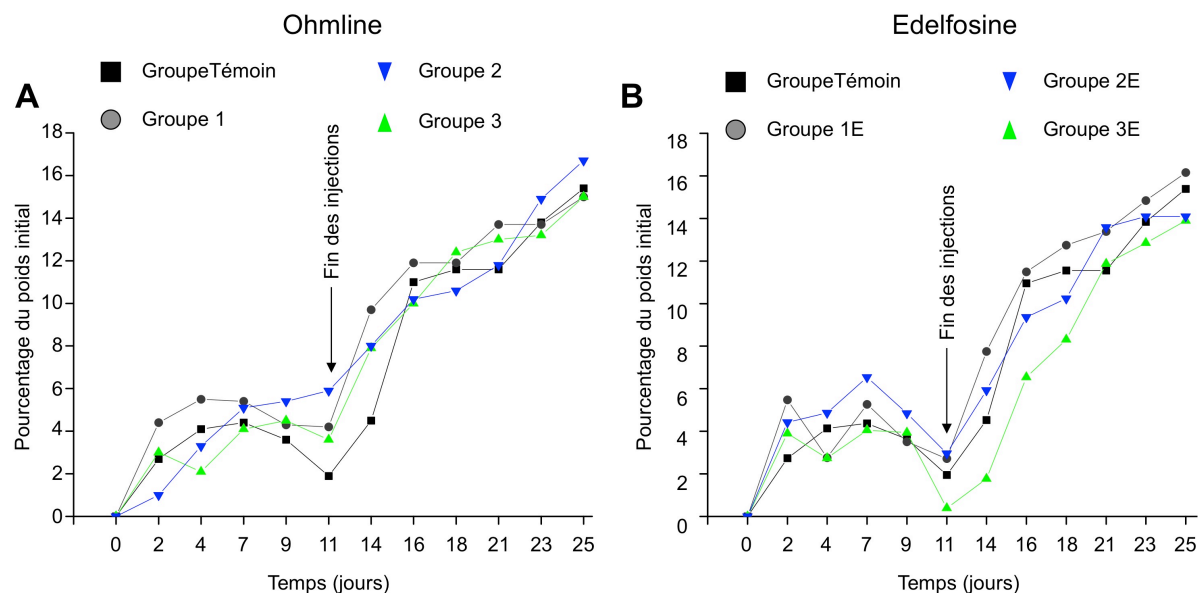
Trois groupes de 9 souris ont également été formés pour tester l'édelfosine. Nous nommerons ces groupes : groupe 1E (0,25 mg/kg), groupe 2E (2,5 mg/kg) et groupe 3E (15 mg/kg).

Un dernier groupe de 9 souris (groupe témoin) recevait des injections du véhicule à la dose maximale de solvant correspondant à celle utilisée dans le groupe 3 soit (2 % éthanol / 3 % DMSO du volume total injecté).

Le protocole se déroule sur 4 semaines. Les souris reçoivent 1 injection par jour d'Ohmlin, d'édelfosine ou de véhicule, 5 jours par semaine pendant 2 semaines. A la fin de cette première période, 3 souris de chaque groupe sont sacrifiées pour analyser une éventuelle toxicité macroscopique sur les organes : le cœur et le foie. Le comportement et la prise de poids des 6 souris restantes, dans chaque groupe, sont contrôlés pendant les deux semaines suivantes sans injection. A la fin de cette période d'observation, les souris sont sacrifiées pour surveiller à nouveau l'apparition d'une toxicité sur les mêmes organes.

Lors des deux premières semaines, les injections quotidiennes d'Ohmlin ou d'édelfosine n'ont pas perturbé la prise de poids des souris par rapport au groupe témoin (Figure 58). Il faut cependant noter que l'ensemble des souris présente une diminution simultanée de la prise de poids à la fin des deux premières semaines (fin des injections). Les souris ont présenté un comportement de stress pendant les 5 à 15 minutes suivant les injections. Les traitements

n'ont pas entraîné d'autre effet secondaire visible quelle que soit la dose utilisée. L'observation des organes *ex vivo* à la fin des injections n'a pas mis en évidence de toxicité macroscopique.



**Figure 58. Evolution du poids des souris au cours de l'expérimentation de toxicité.**

Evolution du poids des souris ayant reçu les injections d'Ohmliné (A) et ayant reçu les injections d'édelfosine (B). Les valeurs sont représentées sous la forme de médiane des différents groupes.

Lors de la deuxième partie de l'étude (2 semaines sans traitement), aucune anomalie n'a été observée sur le plan pondéral (Figure 58) ou comportemental. A la fin de la seconde période (observation), les sacrifices n'ont pas mis en évidence de toxicité macroscopique sur le cœur et le foie. Des observations histologiques de coupe de foie ont confirmé cette absence de toxicité.

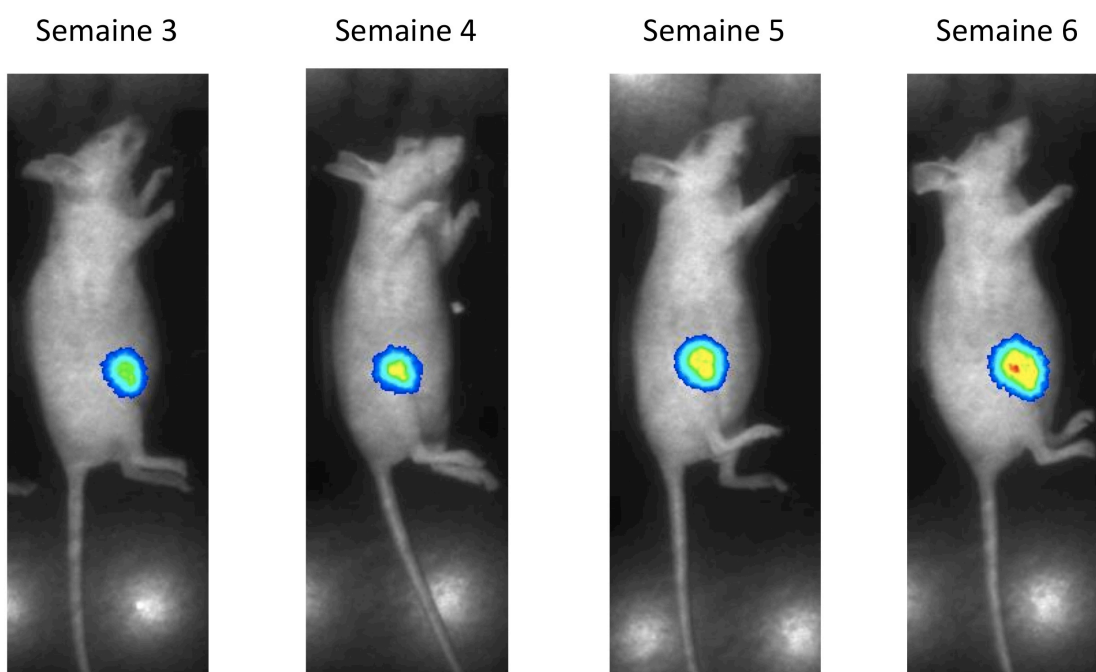
Au cours de cette première expérience, nous avons observé que l'Ohmliné ne semblait pas présenter d'effet délétère lors de son utilisation par injection intraveineuse aux concentrations utilisées. Par la suite, nous avons utilisé la dose maximale testée (15 mg/kg) pour évaluer l'effet de l'Ohmliné sur le développement tumoral. Concernant l'édelfosine, nous n'avons pas observé d'effet toxique. Ce résultat nous conduit à évaluer également son activité dans les modèles de développement tumoral à la dose de 15 mg/kg. Nous avons étudié l'incorporation de l'Ohmliné et de l'édelfosine dans différents organes de ces souris non cancéreuses. Ces résultats seront présentés ultérieurement (Quantification de l'incorporation de l'Ohmliné, page 193).

## 2. Effets de l'Ohmline et de l'édelfosine sur le développement tumoral

### a) Effets de l'Ohmline et de l'édelfosine sur le développement de la tumeur primaire

Nous avons testé l'activité de l'Ohmline et de l'édelfosine dans le modèle de xénogreffe orthotopique dans le but (i) de déterminer l'effet de ces composés sur la tumeur primaire et (ii) d'observer leurs activités sur le développement de métastases. Ce modèle est un modèle où les métastases se développent à partir de la tumeur primaire (pour illustration, Figure 59). Le protocole utilisé pour cette expérimentation est décrit page 142. Brièvement, nous avons prétraité les cellules pendant 24 heures avec 1  $\mu$ M d'Ohmline ou 1  $\mu$ M d'édelfosine avant de réaliser la greffe des cellules cancéreuses MDA-MB-435s shRD (SK3+) au niveau du bourgeon mammaire en formation. Soixante souris ont été réparties en trois groupes :

- groupe 1 (Témoin) : recevant les injections de véhicule 3 fois par semaine
- groupe 2 (Ohmline) : recevant les injections d'Ohmline à 15 mg/kg trois fois par semaine
- groupe 3 (Edelfosine) : recevant les injections d'édelfosine à 15 mg/kg trois fois par semaine

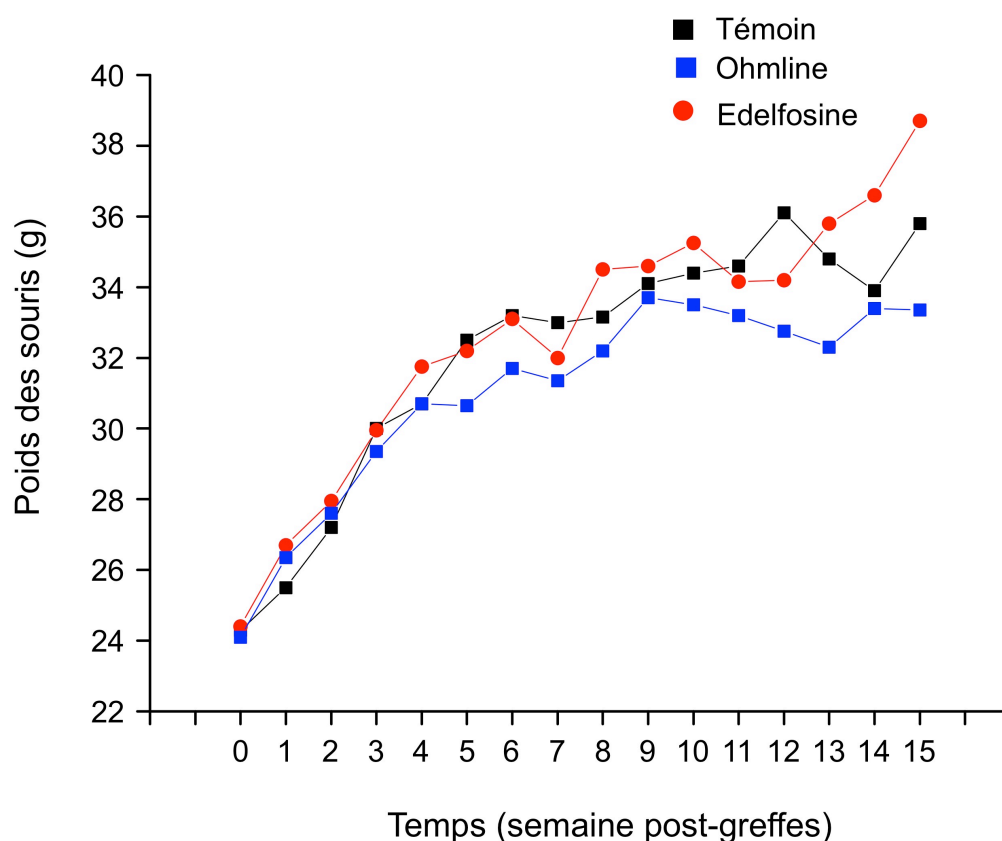


**Figure 59. Illustration du suivi du développement de la tumeur primaire par bioluminescence.**

Suivi du développement de la tumeur d'une souris du groupe témoin les semaines 3, 4, 5 et 6 après la greffe des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-435sshRD (SK3+) dans le bourgeon mammaire en formation.

Lors de la réalisation de cette expérimentation, nous avons décidé de retirer la tumeur primaire lorsque le volume de celle-ci atteignait 500 mm<sup>3</sup>. Nous avons fait ce choix car (i) le développement des métastases se fait à volume constant (une tumeur plus volumineuse peut entraîner la formation de plus de métastases (Koscielny, S. *et al.*, 1989)), (ii) il a été montré que le retrait de la tumeur primaire favorisait le développement de métastases (Zhao, T. *et al.*, 2008) et (iii) nous souhaitions nous rapprocher de ce qui est fait en clinique, le retrait de la tumeur primaire est généralement réalisé. Ce modèle nous a permis de déterminer les effets de l'Ohmlin et de l'édelfosine sur le développement de la tumeur primaire ainsi que leurs effets sur le développement des métastases après le retrait de la tumeur primaire. Nous avons conservé certains tissus dont la tumeur primaire afin d'y quantifier l'incorporation de l'Ohmlin et de l'édelfosine.

Au cours de ce protocole, nous n'avons constaté aucune différence de la prise de poids entre le groupe témoin et les groupes édelfosine et Ohmlin (Figure 60).

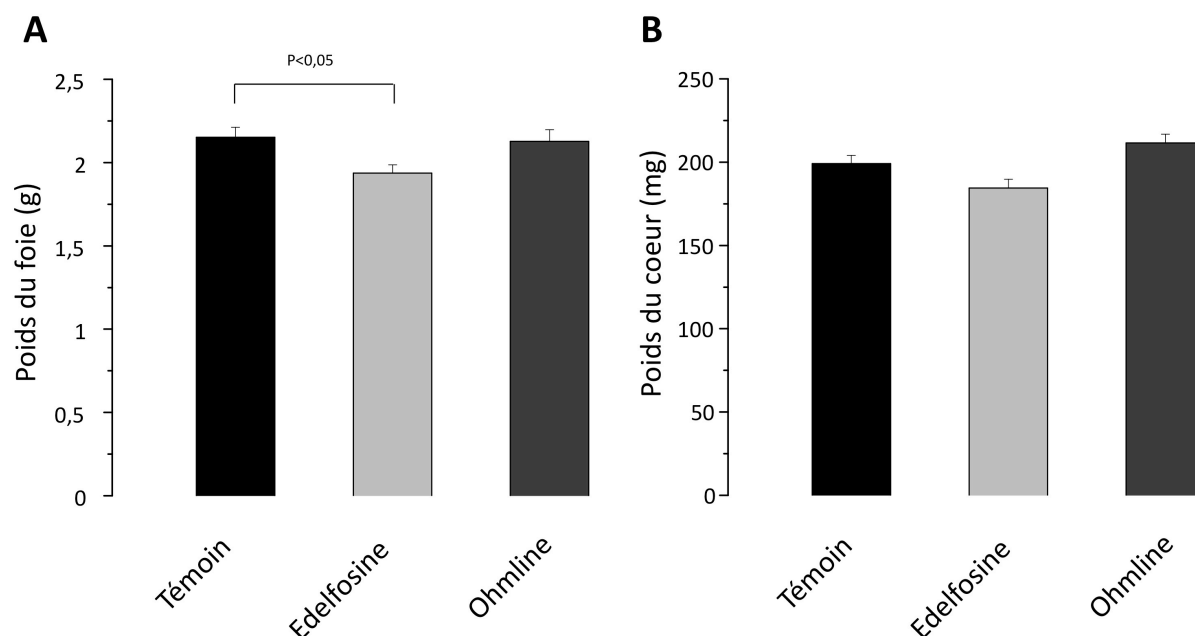


**Figure 60. Evolution du poids des souris traitées ou non avec 15 mg/kg d'Ohmlin et 15 mg/kg d'édelfosine dans le modèle de xénogreffe orthotopique.**

Le temps 0 correspond à la greffe des cellules dans le bourgeon mammaire. La semaine 15 correspond au sacrifice des souris. Les données représentent les médianes de chaque groupe.



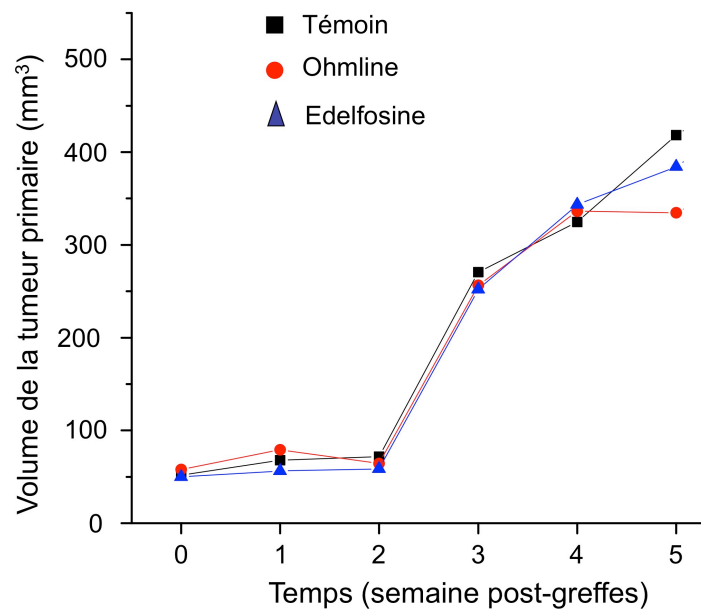
L'Ohmline n'a pas entraîné de variation de la masse du foie et du cœur (Figure 61). Par contre, l'édelfosine a entraîné une diminution significative du poids du foie, ce qui pourrait être signe d'une certaine hépatotoxicité, mais elle n'a pas d'effet sur le cœur (Figure 61).



**Figure 61. Influence de l'Ohmline et de l'édelfosine sur le poids du foie et sur le poids du cœur.**

Mesure du poids du foie (A) et de cœur (B) des souris traitées ou non avec l'Ohmline et l'édelfosine (15 mg/kg). N = 16 souris pour groupes témoin et Ohmline, N = 18 pour groupe édelfosine.

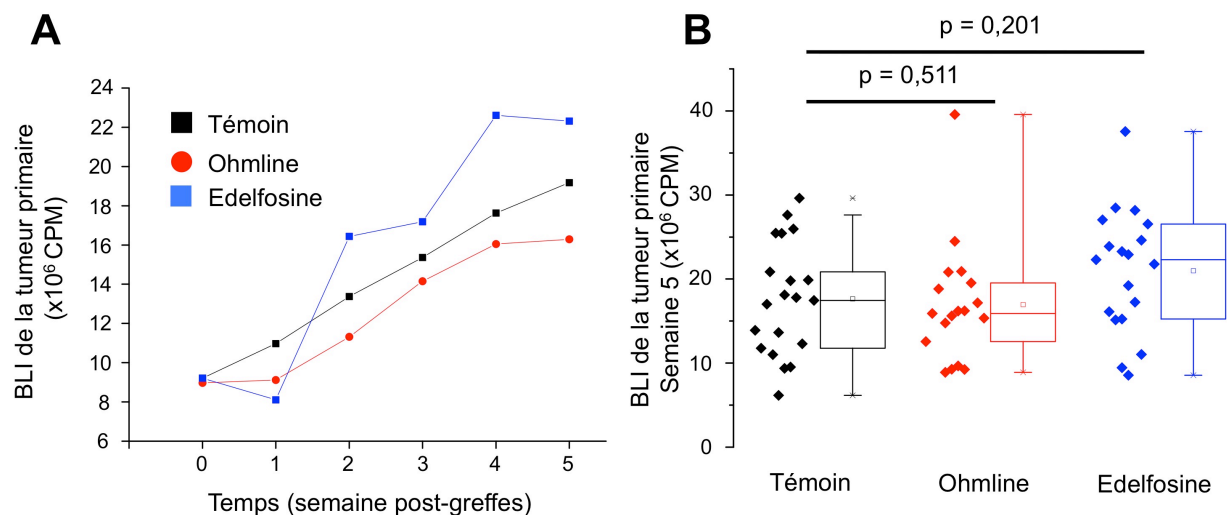
Comme nous l'avons précisé le retrait de la tumeur primaire a été réalisé à un volume constant de 500 mm<sup>3</sup> pour toutes les souris. Certaines tumeurs n'ont jamais atteint le volume souhaité : 2 dans le groupe 1 (témoin), une dans le groupe 2 (Ohmline) et une dans le groupe 3 (édelfosine). Ces souris ne seront donc pas incluses dans l'analyse. Si nous analysons l'évolution du volume des tumeurs au cours du temps (mesures réalisées au pied à coulisse), nous constatons que l'Ohmline et l'édelfosine n'affectent pas la croissance de la tumeur primaire (Figure 62). Pour l'édelfosine, nous ne retrouvons pas l'effet sur la tumeur primaire décrit dans la littérature mais pour des concentrations plus importantes (30 mg/kg) (Gajate, C. *et al.*, 2002).



**Figure 62. Evolution du volume de la tumeur primaire des souris traitées ou non avec 15 mg/kg d'Ohmlin ou 15 mg/kg d'édelfosine dans le modèle de xénogreffe orthotopique.**

Les données sont représentées sous la forme des médianes des groupes.

Nous avons montré lors d'expériences antérieures que la bioluminescence (BLI) émise était corrélée au volume de la tumeur jusqu'à environ 600 mm<sup>3</sup> (données non publiées). Nous sommes donc dans la gamme de volume où la relation entre le volume de la tumeur primaire et la BLI est linéaire. Ainsi, l'évolution de la BLI de la tumeur primaire du groupe témoin est identique à celle des groupes Ohmlin et édelfosine (Figure 63A).



**Figure 63. Evolution de la BLI de la tumeur primaire des souris traitées ou non avec 15 mg/kg d'Ohmlin ou d'édelfosine dans le modèle de xénogreffe orthotopique.**

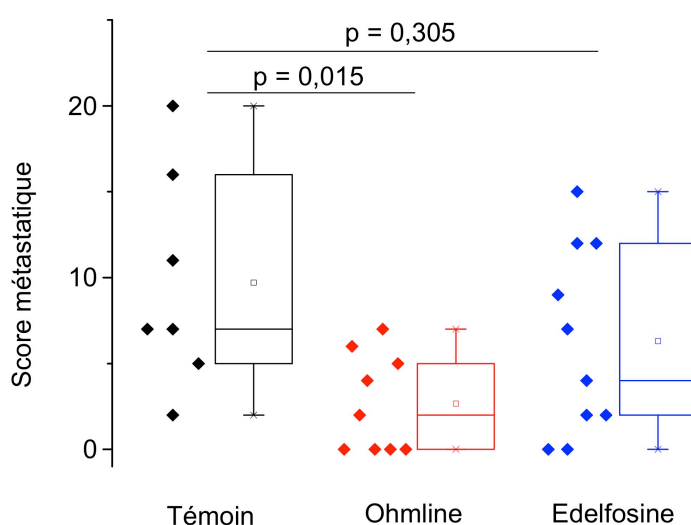
A. Evolution de la BLI des tumeurs. Les données sont représentées sous la forme des médianes des groupes de souris traitées ou non. B. BLI de la tumeur primaire des souris à 5 semaines post-greffe.

Ainsi, cinq semaines après la greffe des cellules cancéreuses, il n'y a pas de différence significative entre la BLI du groupe témoin et celle des deux groupes traités (Figure 63B). L'absence de différence significative entre les valeurs de BLI des trois groupes indique que le nombre de cellules cancéreuses est identique quel que soit le groupe. L'Ohmlin et l'édelfosine n'ont pas d'effet sur la croissance de la tumeur primaire, ce qui est cohérent avec la figure 62.

#### b) Effet de l'Ohmlin et de l'édelfosine sur le développement des métastases

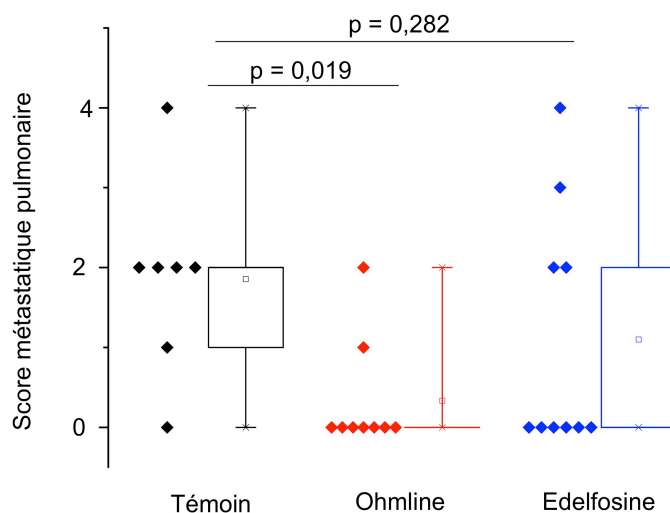
Nous avons poursuivi l'étude de l'Ohmlin et de l'édelfosine sur le développement tumoral en étudiant l'effet de ces lipides sur la formation de métastases. Nous nous sommes focalisés sur les métastases pulmonaires et osseuses car ce sont les sites préférentiellement colonisés dans les modèles que nous utilisons. Un score métastatique (qui tient compte du nombre de métastases et de la BLI mesurée *ex vivo*) est déterminé pour les trois groupes de souris. Cette valeur nous permet de quantifier le développement métastatique global en fin d'expérience.

Dans le modèle de xénogreffe orthotopique, l'analyse portera sur les souris ayant reçu 14 semaines de traitement, ce qui correspond aux effectifs suivants : 7 souris pour le groupe témoin, 9 souris pour le groupe Ohmlin et 10 souris pour le groupe édelfosine. Le groupe Ohmlin présente un score métastatique diminué en comparaison du groupe témoin (Figure 64) contrairement au groupe édelfosine qui ne change pas significativement ce score par rapport au groupe témoin (Figure 64).



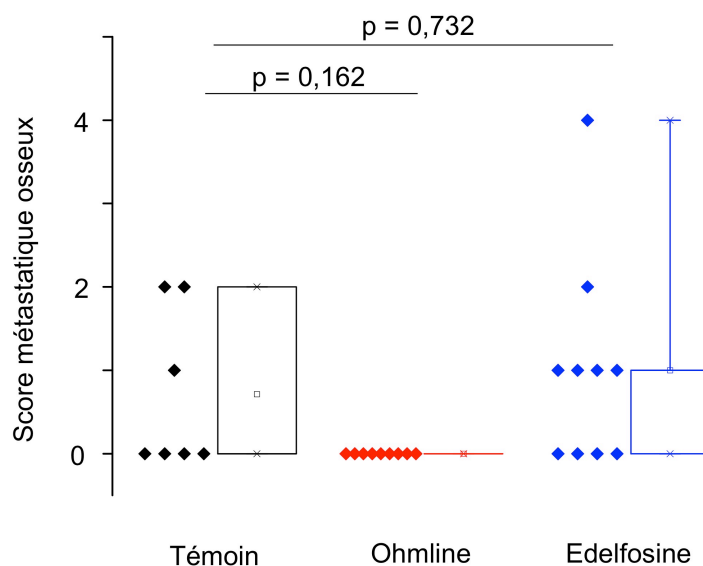
**Figure 64. Score métastatique des souris traitées ou non avec 15 mg/kg d'Ohmlin ou 15 mg/kg d'édelfosine dans le modèle de xénogreffe orthotopique.**

Nous avons voulu savoir quel était l'effet de ces lipides sur le développement des métastases pulmonaires et osseuses. L'Ohmlin entraîne une diminution significative du score métastatique pulmonaire contrairement à l'édelfosine qui n'a pas d'effet sur le développement de ces métastases pulmonaires (Figure 65).



**Figure 65. Score métastatique pulmonaire des souris traitées ou non avec 15 mg/kg d'Ohmlin ou 15 mg/kg d'édelfosine dans le modèle de xénogreffe orthotopique.**

A l'opposé de son effet sur les métastases pulmonaires, l'Ohmlin n'entraîne pas de diminution significative du score métastatique osseux (Figure 66). L'édelfosine n'a pas non plus d'effet sur les métastases osseuses (Figure 66).



**Figure 66. Score métastatique osseux des souris traitées ou non avec 15 mg/kg d'Ohmlin ou 15 mg/kg d'édelfosine dans le modèle de xénogreffe orthotopique.**

Par ailleurs, nous observons que l'Ohmlin a tendance à diminuer la fréquence des métastases pulmonaires et osseuses (Tableau 10). L'édelfosine a également tendance à diminuer la fréquence des métastases pulmonaires mais à l'inverse, elle n'a pas d'effet voire elle augmente la fréquence des métastases osseuses.

	Groupe témoin	Groupe Ohmlin	Groupe édelfosine
Fréquence des métastases pulmonaires	85 %	22 %	40 %
Fréquence des métastases osseuses	42 %	0 %	60 %

**Tableau 10. Fréquences des métastases pulmonaires et osseuses dans les 3 groupes de souris.**

N = 7 souris dans le groupe témoin, N = 9 souris dans le groupe Ohmlin et N = 10 souris dans le groupe édelfosine. Fréquence des métastases : nombre de souris ayant développé ce type de métastase / nombre total de souris du groupe.

Cette expérimentation a permis de montrer pour la première fois qu'un éther-lipide, l'Ohmlin, était capable de diminuer le développement de métastases sans affecter le développement de la tumeur primaire. Il est à noter que certaines souris qui n'ont reçu que 12 semaines d'injection à 15 mg/kg d'Ohmlin présentent les mêmes résultats pour le développement des métastases. L'efficacité ne semble donc pas être liée à la durée du traitement. Ce composé ne présente pas de toxicité sur la période de traitement de 14 semaines.

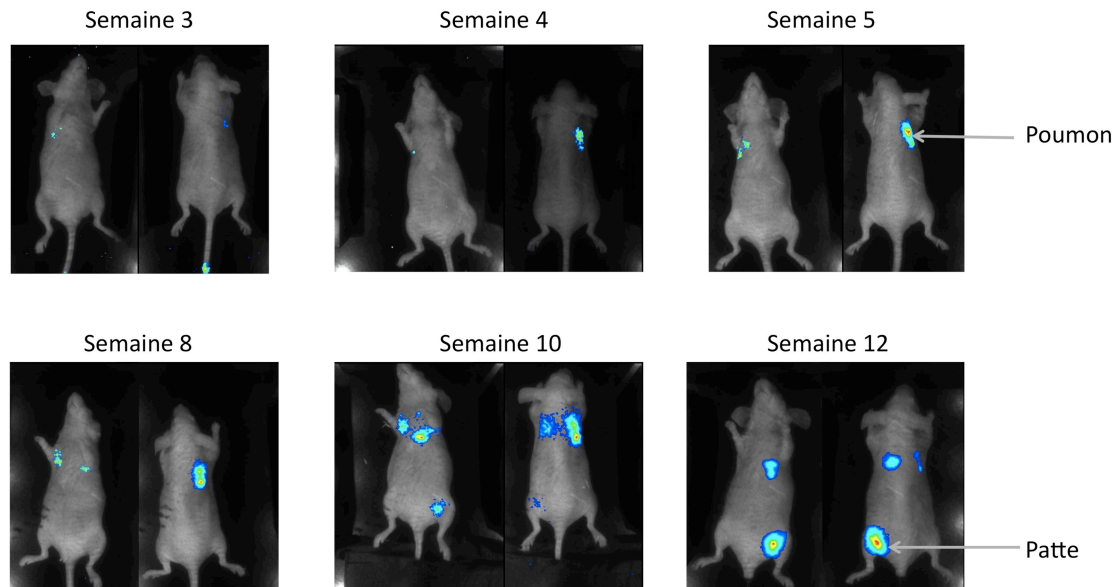
L'édelfosine n'a pas d'effet non plus sur la tumeur primaire et elle ne présente pas d'activité anti-métastatique dans ce modèle. Elle entraîne cependant une tendance à la diminution de la fréquence des métastases pulmonaires.

Pour aller plus loin, nous avons étudié l'activité de l'Ohmlin et de l'édelfosine dans le modèle dit de « métastases expérimentales ». Cette expérience est réalisée selon le protocole présenté page 142. Les cellules prétraitées avec 1  $\mu$ M d'Ohmlin ou 1  $\mu$ M l'édelfosine pendant 24 heures (concentration utilisée dans le modèle précédent et inhibant la migration cellulaire) sont injectées dans la veine caudale directement dans la circulation systémique pour aller coloniser les tissus. Pour cette étude, nous avons utilisé trois groupes de souris :

- groupe 1 Témoin: 12 souris témoins recevant des injections de véhicule 3 fois par semaine pendant 12 semaines,
- groupe 2 Ohmlin : 12 souris recevant des injections d'Ohmlin à 15 mg/kg 3 fois par semaine pendant 12 semaines,

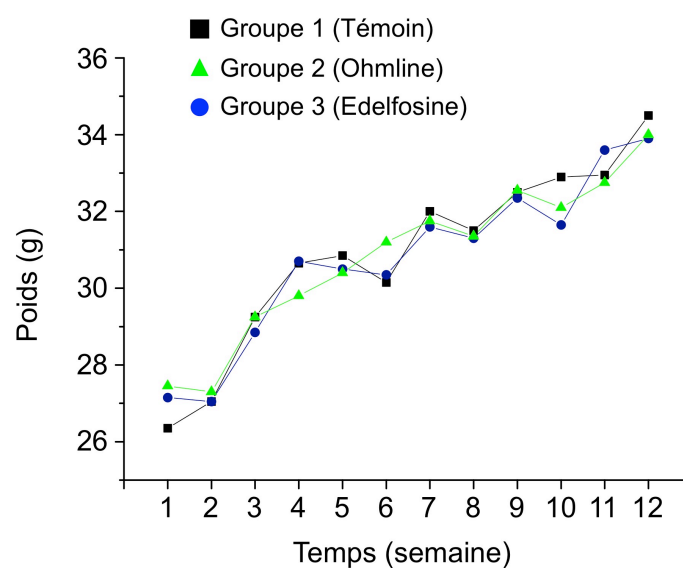
- groupe 3 Edelfosine : 12 souris recevant des injections d'édelfosine à 15 mg/kg 3 fois par semaine pendant 12 semaines.

Nous utilisons les mêmes cellules que précédemment (utilisées *in vitro* et dans le modèle de xénogreffe orthotopique, qui expriment la luciférase), ce qui nous permet de suivre l'évolution des métastases *in vivo* (pour illustration, Figure 67).



**Figure 67. Suivi par bioluminescence de l'évolution de métastases dans une souris témoin.**

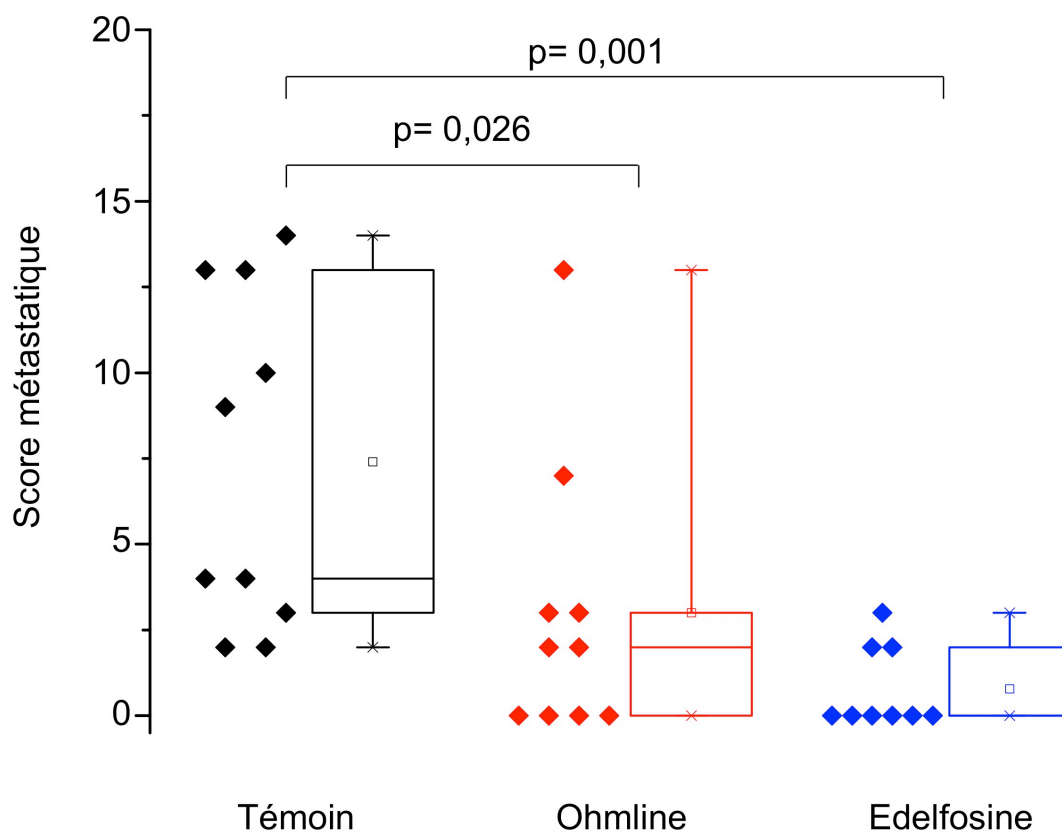
Nous avons une fois de plus constaté une absence de toxicité de l'Ohmline au cours de ce protocole et l'édelfosine n'a également pas présenté d'effet délétère. L'évolution du poids des souris au cours du temps est identique entre les trois groupes (Figure 68).



**Figure 68. Evolution du poids des souris au cours de l'expérience.**

Les données représentent la médiane de chaque groupe.

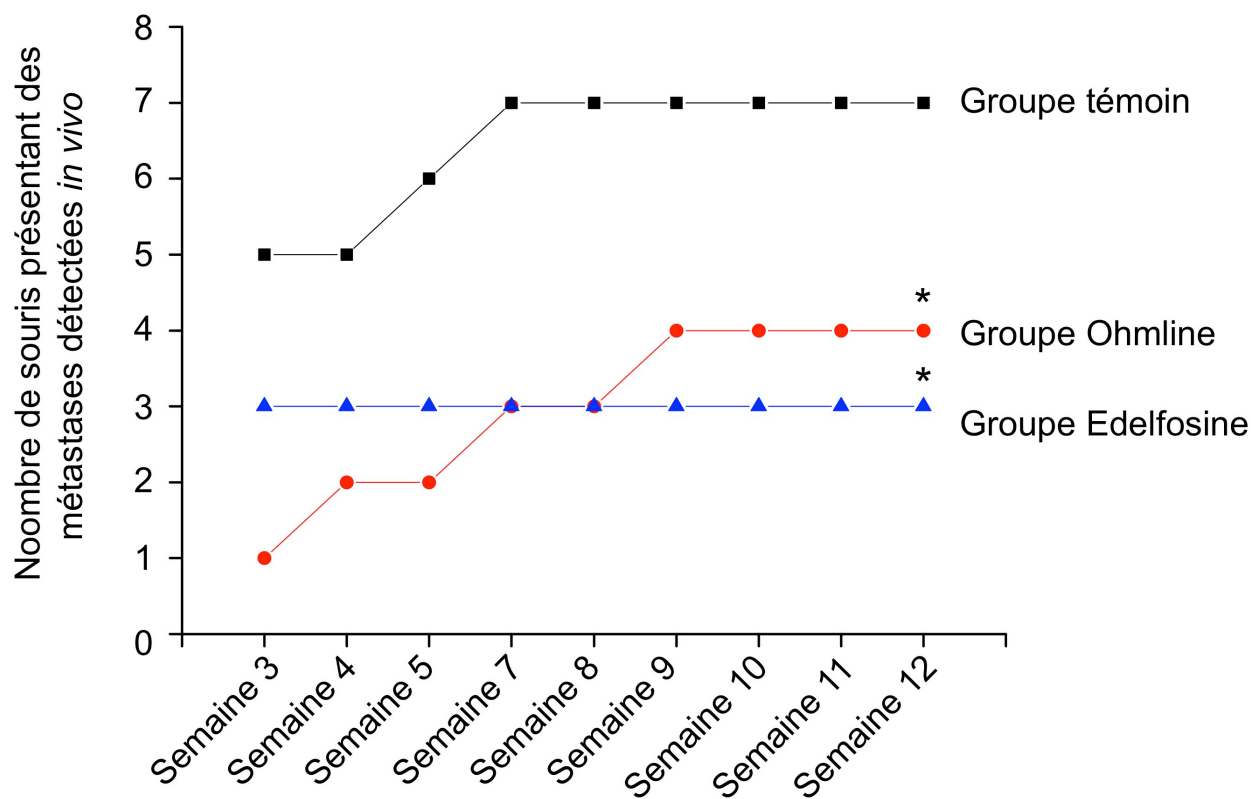
Afin de déterminer l'activité anti-métastatique des composés, nous avons quantifié les métastases à l'aide du score métastatique pour chaque groupe (Figure 69). L'Ohmlin et l'édelfosine réduisent significativement le score métastatique dans ce second modèle.



**Figure 69. Scores métastatiques des souris traitées ou non avec 15 mg/kg d'Ohmlin ou 15 mg/kg d'édelfosine.**

De manière surprenante, l'édelfosine est plus efficace que l'Ohmlin dans ce modèle. En effet, le score médian est de 0 pour le groupe édelfosine et de 2 pour le groupe Ohmlin.

Afin de mieux comprendre l'effet de ces lipides sur le développement des métastases, nous nous sommes intéressés à leurs effets sur la cinétique de l'évolution du nombre de métastases détectées *in vivo* (Figure 70).

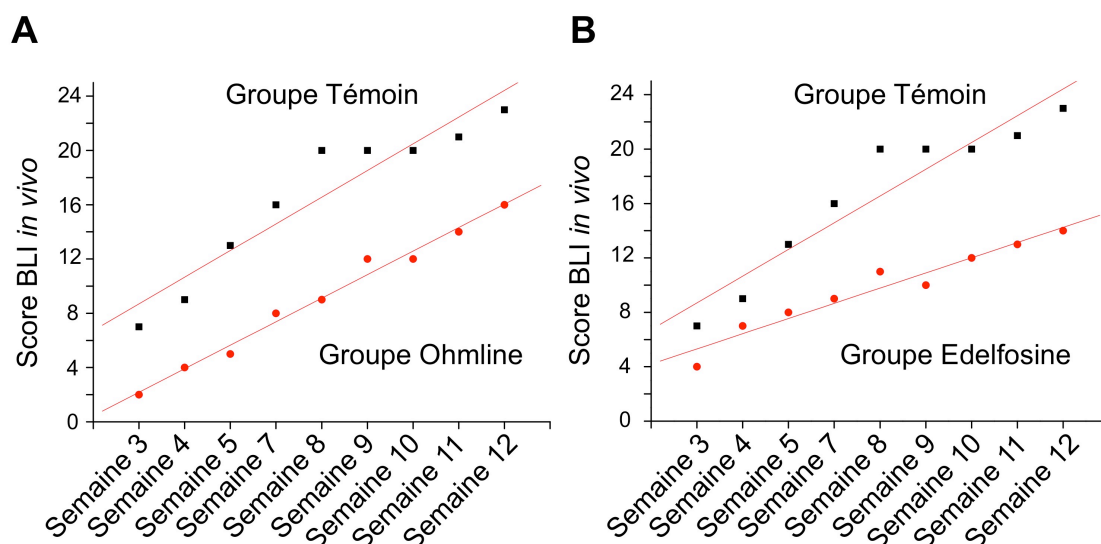


**Figure 70. Nombre de souris présentant des métastases détectées *in vivo*.**

L'Ohmine et l'édelfosine diminuent significativement le nombre de métastases en fin d'expérience. D'autre part, l'Ohmline réduit le développement des métastases alors que l'édelfosine bloque leur développement.

Afin de déterminer si l'Ohmline et l'édelfosine réduisent le développement des métastases en inhibant leur croissance, nous avons étudié l'évolution de la BLI au cours du temps (Figure 71). La pente de la relation entre le score BLI et le temps est identique entre le groupe témoin (pente = 1,966) et le groupe Ohmline (pente = 1,73). Nous observons donc que l'Ohmline n'affecte pas la croissance des métastases contrairement à l'édelfosine (Figure 71).



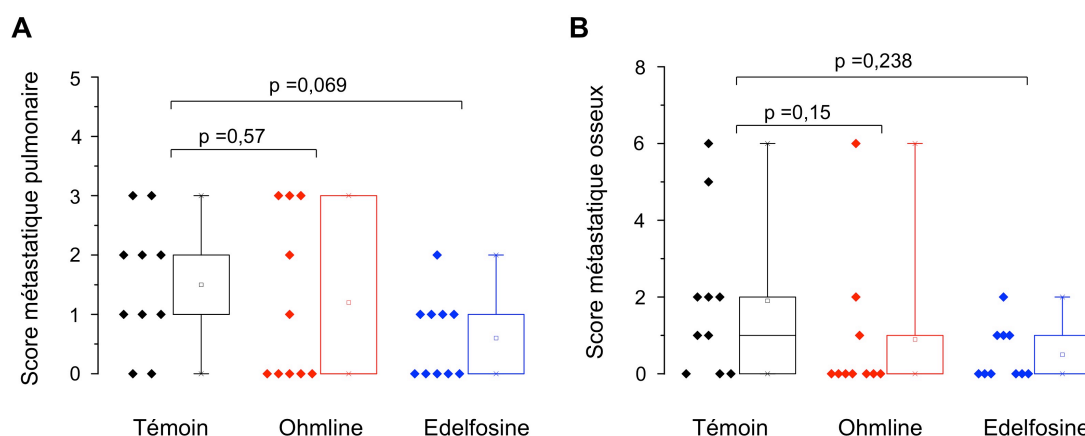


**Figure 71. Evolution du score *in vivo* en fonction du temps.**

A. Evolution de la BLI pour les souris traitées avec 15 mg/kg d'Ohmliné (groupe 2) et B 15 mg/kg d'édelfosine (groupe 3), (valeurs des pentes pour les différents groupes : - groupe 1 : 1,96, - groupe 2 : 1,73 et - groupe 3 : 1,116).

En effet, le groupe édelfosine présente une pente diminuée (pente = 1,116) en comparaison du groupe témoin (Figure 71). Ceci indique que le traitement avec 15 mg/kg d'édelfosine diminue la vitesse de croissance des métastases en plus de retarder leur apparition. Cette donnée suggère que l'édelfosine pourrait avoir un effet antiprolifératif sur les cellules cancéreuses qui forment les métastases dans ce modèle.

Les sites métastatiques principaux de ce modèle sont également les poumons et l'os. L'Ohmliné et l'édelfosine n'ont pas d'effet sur les scores métastatiques pulmonaires et osseux (Figure 72).



**Figure 72. Scores métastatiques pulmonaire et osseux pour les 3 groupes de souris.**

Score métastatique pulmonaire (A) et osseux (B) pour les souris traitées ou non avec 15 mg/kg d'Ohmliné ou 15 mg/kg d'édelfosine.

Les groupes Ohmlin et édelfosine présentent des fréquences de métastases plus faibles que celles du groupe témoin sur les deux sites métastatiques principaux de ce modèle (os et poumons) (Tableau 11).

	Témoin	Ohmlin	Edelfosine
Fréquence des métastases pulmonaires	100 %	60 %	50 %
Fréquence des métastases osseuses	70 %	30 %	20 %

**Tableau 11. Fréquences des métastases pulmonaires et osseuses dans les différents groupes.**

Dans ce modèle, l'Ohmlin diminue le développement métastatique en réduisant le nombre de métastases osseuses et pulmonaires car même si les effets ne sont pas significatifs pour ces deux sites, il existe une tendance à la diminution pour la survenue de ces deux événements. L'édelfosine diminue également le score métastatique mais elle agit sur un paramètre supplémentaire. Elle diminue également le nombre de métastases pulmonaires et osseuses mais de plus elle ralentit la croissance des métastases après que celles-ci se soient établies.

Nous avons observé des différences d'effets de l'Ohmlin et de l'édelfosine entre les deux modèles. L'Ohmlin est plus efficace dans le modèle de xénogreffe orthotopique. A l'opposé, l'édelfosine qui n'a pas d'activité anti-métastatique dans le premier modèle montre un potentiel anti-métastatique supérieur à celui de l'Ohmlin dans le modèle de « métastases expérimentales ». Ces résultats suggèrent que malgré l'absence d'effet de ces lipides sur le développement de la tumeur primaire, cette dernière aurait un rôle sur l'activité des composés envers les métastases. Ce rôle reste à être élucidé.

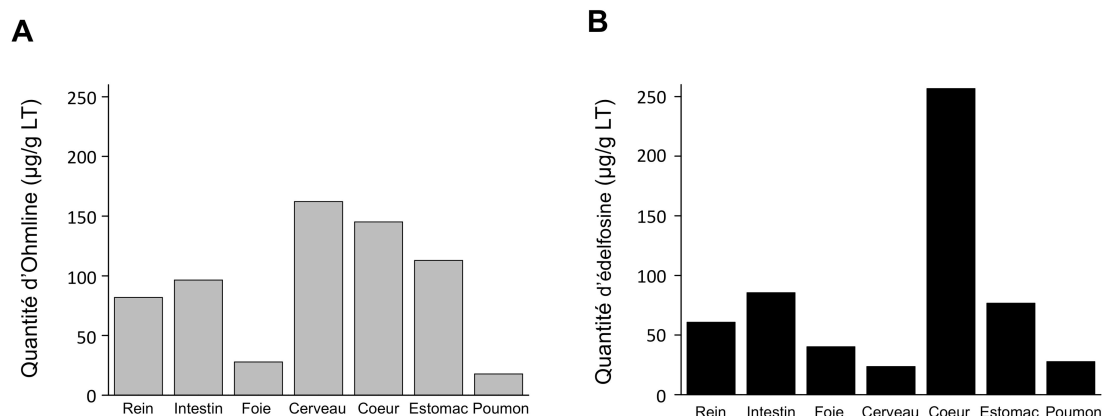
## B. Mesure de l'incorporation de l'Ohmlin et de l'édelfosine

### 1. Mise au point de la mesure

Nous avons utilisé les organes prélevés lors de l'expérience de toxicité afin de réaliser la mise au point de la mesure de l'Ohmlin et de l'édelfosine dans les tissus murins. Une fois cette technique validée, nous avons mesuré la quantité de ces lipides dans les tissus tumoraux des modèles de cancers métastatiques.

Ainsi, l'incorporation de l'Ohmlin et de l'édelfosine a été mesurée dans les tissus prélevés durant le premier sacrifice de l'expérience de toxicité (à la fin des 2 semaines de traitement) pour les injections à 15 mg/kg. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 73. La

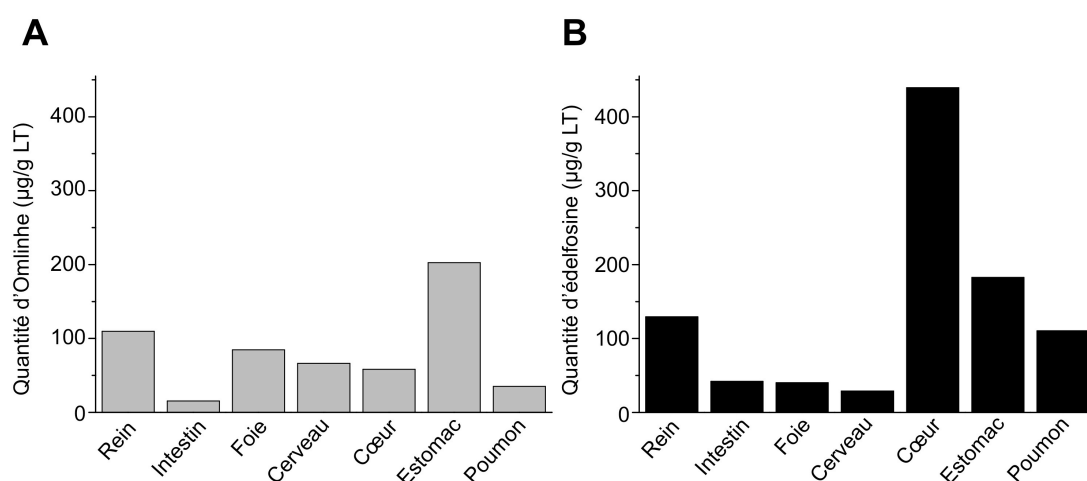
première observation est que l'Ohmline et l'édelfosine sont incorporées dans l'ensemble des tissus que nous avons prélevés. L'Ohmline s'est majoritairement incorporée dans le cerveau, le cœur et l'estomac. A l'opposé des quantités plus faibles sont retrouvées dans le foie et les poumons. Pour l'édelfosine, le site principal d'incorporation est le cœur (Figure 73).



**Figure 73. Mesure de la quantité d'Ohmline et d'édelfosine incorporées dans les tissus de souris non cancéreuses ayant reçu des injections à 15 mg/kg.**

Quantification de l'Ohmline (A) et de l'édelfosine (B) dans les tissus de souris non cancéreuses. Les souris ont reçu 5 injections d'Ohmline à 15 mg/kg ou d'édelfosine à 15 mg/Kg par semaine pendant 2 semaines. Six organes pour chaque site ont été regroupés pour réaliser l'extraction des lipides.

Nous avons alors voulu évaluer le seuil de détection de la technique. La mesure de la quantité d'Ohmline et d'édelfosine a été réalisée dans les tissus des souris ayant été traitées 2 semaines avec les injections à 2,5 mg/kg d'éther-lipides. Nous avons constaté que la mesure est possible suite à des injections d'éther-lipides 10 fois plus faibles et que les deux éther-lipides s'incorporent dans tous les tissus prélevés et étudiés (Figure 74).



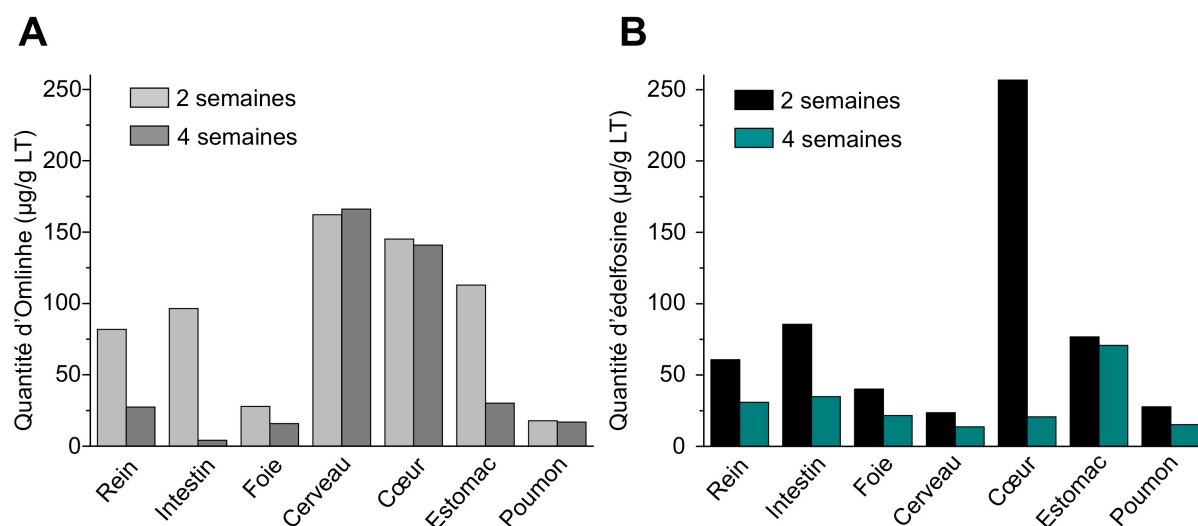
**Figure 74. Mesure de la quantité d'Ohmline et d'édelfosine incorporée dans les tissus de souris non cancéreuses ayant reçu des injections à 2,5 mg/kg.**

Mesure de la quantité d'Ohmline (A) et d'édelfosine (B) dans les tissus de souris non cancéreuses. Les souris ont reçu 5 injections d'Ohmline à 2,5 mg/kg ou d'édelfosine à 2,5 mg/kg par semaine pendant 2 semaines. Pour chaque site, six organes ont été regroupés pour réaliser l'extraction des lipides.

Si l'on diminue de 10 fois la quantité d'éther-lipides injectée, il serait logique d'en trouver moins dans les tissus. Ceci est vrai pour l'Ohmlin pour l'intestin, le cerveau, le cœur. Cependant, les mêmes quantités d'Ohmlin ont été mesurées dans les poumons et les reins et de façon surprenante la quantité d'Ohmlin incorporée dans le foie et l'estomac augmente par rapport à la quantité détectée lors des injections à 15 mg/kg.

Concernant l'incorporation de l'édelfosine, elle est diminuée comme pour l'Ohmlin dans l'intestin. Alors qu'elle est identique à celle retrouvée après traitement à 15 mg/kg dans le foie et le cerveau, elle augmente dans les reins, le cœur, l'estomac et les poumons. Ces résultats surprenants mériteraient que les expériences soient reproduites.

Nous avons profité de l'expérience de toxicité pour déterminer si les éther-lipides étaient encore présents dans les tissus après deux semaines sans traitement. Nous avons constaté que l'on retrouvait ces lipides mais que cela était dépendant du tissu (Figure 72). Pour l'Ohmlin, les quantités présentes dans le cerveau, le cœur et les poumons sont stables deux semaines après l'arrêt du traitement (Figure 75). A l'opposé, nous constatons une forte diminution pour les reins, l'intestin, le foie et l'estomac (Figure 75). Les résultats obtenus pour l'intestin et l'estomac peuvent s'expliquer par le taux de renouvellement cellulaire élevé de ces organes.



**Figure 75. Evaluation de la stabilité de l'incorporation de l'Ohmlin et de l'édelfosine dans les tissus de souris non cancéreuses ayant reçu des injections à 15 mg/kg.**

Evaluation de la stabilité de l'incorporation de l'Ohmlin (A) et de l'édelfosine (B). Les histogrammes 2 semaines correspondent aux souris ayant reçu 5 injections d'Ohmlin et d'édelfosine à 15 mg/kg et sacrifiées à l'arrêt du traitement. Les histogrammes 4 semaines correspondent aux souris ayant reçu les mêmes traitements mais sacrifiées après deux semaines supplémentaires sans traitement.

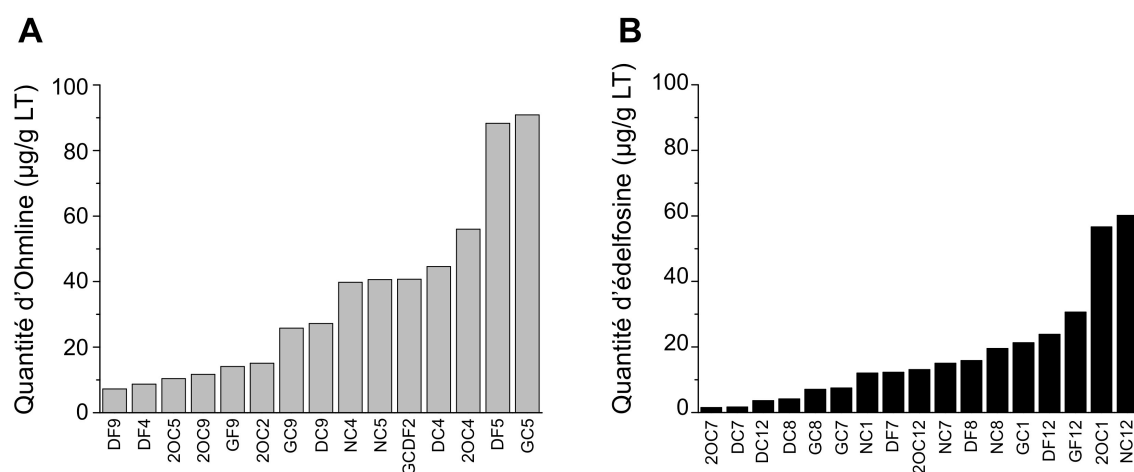
L'incorporation de l'édelfosine semble moins stable que celle de l'Ohmline. En effet, excepté l'estomac où la quantité d'édelfosine incorporée reste stable après deux semaines sans injection, tous les autres organes présentent une diminution de l'incorporation (Figure 75).

Ainsi, il est possible de mesurer les quantités d'édelfosine et d'Ohmline pour des traitements à des doses inférieures à celle utilisée pour les modèles de cancers métastatiques ce qui indique que le seuil de détection est correct et utilisable pour l'analyse des tissus tumoraux. Par ailleurs, il est probablement nécessaire d'adapter la durée du traitement en fonction de l'organe que l'on souhaite enrichir avec l'édelfosine et l'Ohmline.

## 2. Mesure de l'incorporation de l'Ohmline et de l'édelfosine dans la tumeur primaire

Lors de l'utilisation du modèle de xénogreffe orthotopique, nous avons prélevé, en plus des tissus présentés auparavant, la tumeur primaire et les os dans lesquels nous avons mesuré les quantités d'Ohmline et d'édelfosine incorporées.

L'Ohmline et l'édelfosine se sont bien incorporées dans les tumeurs primaires des souris (Figure 76).



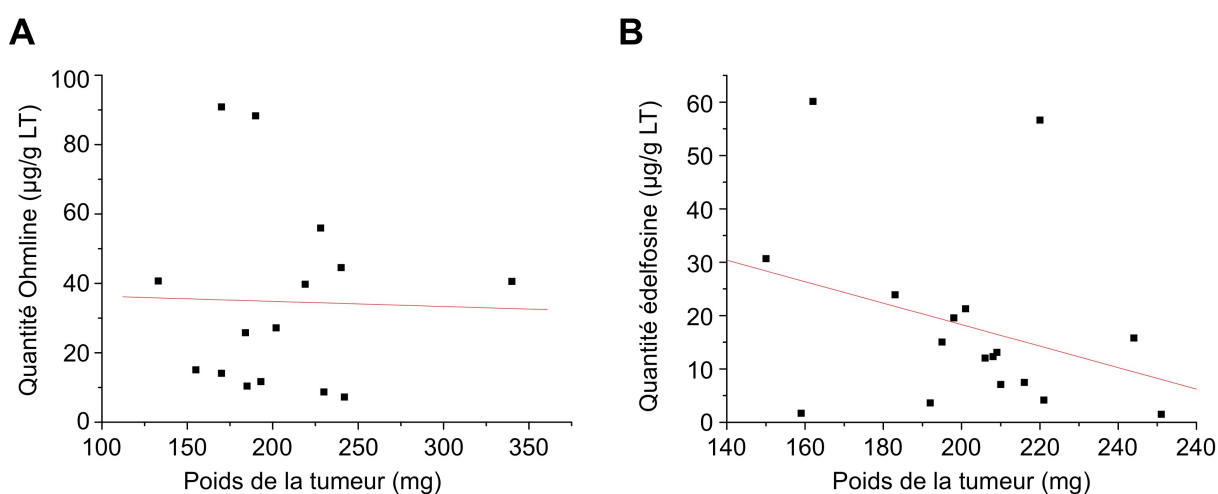
**Figure 76. Quantification de l'incorporation de l'Ohmline et de l'édelfosine dans les tumeurs primaires.**

Quantités d'Ohmline (A) et d'édelfosine (B) incorporées dans les tumeurs primaires. Les indications sous les histogrammes correspondent à l'identifiant de la souris.

L'Ohmline a tendance à être présente en plus grande quantité que l'édelfosine dans les tumeurs (médiane Ohmline = 27,2 µg/g LT ; médiane édelfosine = 13,1 µg/g LT). Comme le

montre la figure 76, l'incorporation de l'Ohmline ou de l'édelfosine est dépendante de la tumeur primaire.

Nous avons donc testé l'hypothèse qu'il existait une relation entre le poids de la tumeur et la quantité d'éther lipide incorporée : logiquement les plus grosses tumeurs auraient dû incorporer plus d'éther-lipide que les petites tumeurs or, il n'existe pas de relation entre la quantité incorporée d'Ohmline ou d'édelfosine et le poids de la tumeur (Figure 77). Les coefficients de corrélation pour l'Ohmline et l'édelfosine sont respectivement de - 0,0269 et - 0,31848.



**Figure 77. Relation entre le poids de la tumeur primaire et la quantité d'éther-lipide incorporée.**

Relation entre le poids de la tumeur primaire et la quantité d'Ohmline incorporée (A) ou la quantité d'édelfosine incorporée (B).

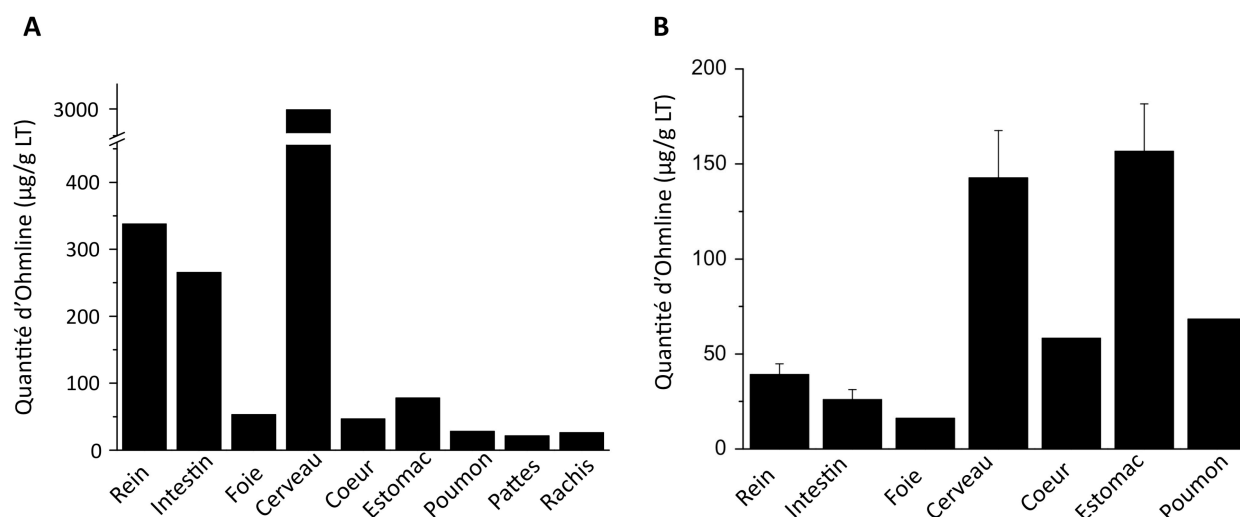
Nous avons également constaté qu'il n'existait pas de relation évidente entre la quantité d'Ohmline incorporée dans la tumeur primaire et son efficacité sur le score métastatique. Par exemple, la souris GF9 qui présente une tumeur ayant incorporé peu d'Ohmline n'a présenté aucune métastase. A l'inverse, la souris GC5 dont la tumeur a incorporé le plus d'Ohmline présente un score métastatique élevé. Il serait néanmoins intéressant d'augmenter le nombre d'échantillons afin de confirmer cette absence de relation.

L'absence d'effet sur le développement de la tumeur primaire de ces molécules n'est donc pas due à un manque d'incorporation. Par ailleurs, si l'Ohmline et l'édelfosine avaient réduit le développement de la tumeur primaire, la relation entre la masse de la tumeur et l'incorporation aurait dû être significative.

### 3. Incorporation de l'Ohmline et de l'édelfosine dans les tissus métastatiques

Lors des expérimentations utilisant le modèle de xénogreffe orthotopique et le modèle de « métastases expérimentales », nous avons prélevé différents tissus afin d'y mesurer l'incorporation des éther-lipides.

Quel que soit le modèle utilisé, l'Ohmline s'incorpore dans tous les tissus prélevés des souris cancéreuses (Figure 78). Il est important de noter que cet éther-lipide s'est incorporé dans les deux tissus présentant des métastases, les poumons et l'os. L'incorporation de l'os n'a pas été évaluée dans le modèle de « métastases expérimentales » car au moment de la réalisation des mesures pour les tissus prélevés lors de ce protocole, la quantification pour ce tissu n'avait pas été mise au point.

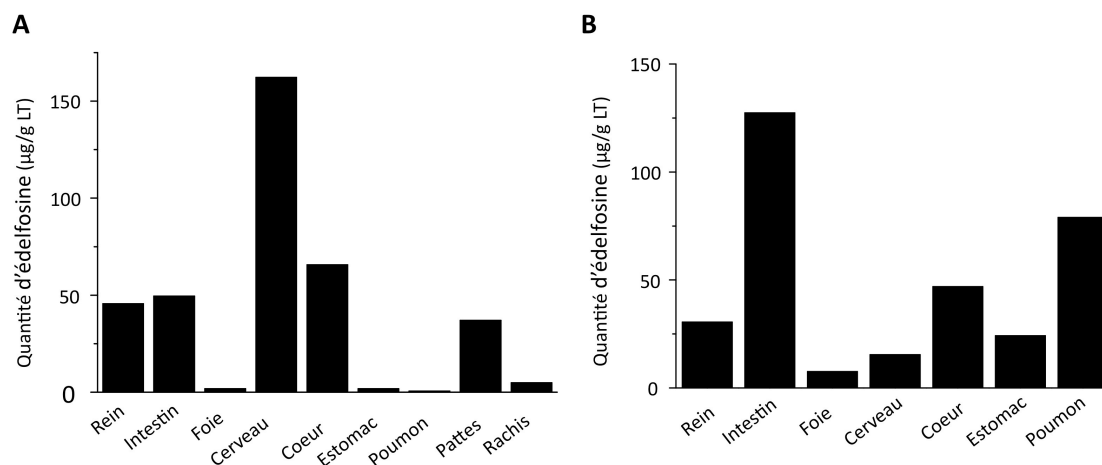


**Figure 78. Incorporation de l'Ohmline dans les tissus de souris cancéreuses.**

Incorporation de l'Ohmline dans les tissus prélevés lors de l'expérimentation conduite sur le modèle de xénogreffe orthotopique (A) et dans les tissus prélevés lors de l'expérience de « métastases expérimentales » (B).

Ces résultats suggèrent que l'efficacité de l'Ohmline sur le développement des métastases peut être dépendante de son incorporation dans les tissus métastasés. Quel que soit le modèle, c'est dans le cerveau qu'elle s'incorpore le plus puis les reins et l'intestin. Ceci est concordant avec les expériences précédentes avec cependant une incorporation bien plus augmentée dans le cerveau que dans les reins et l'intestin.

L'édelfosine s'incorpore également dans tous les tissus prélevés chez les souris cancéreuses des deux expériences (Figure 79). C'est aussi dans le cerveau que l'on retrouve le plus d'édelfosine mais en moins grande quantité que pour l'Ohmline.



**Figure 79. Incorporation de l'édelfosine dans les tissus de souris cancéreuses.**

Incorporation de l'édelfosine dans les tissus prélevés lors de l'expérimentation conduite sur le modèle de xénogreffe orthotopique (A) et dans les tissus prélevés lors de l'expérience de « métastases expérimentales » (B).

L'Ohmline diminue les métastases osseuses et pulmonaires dans les deux modèles ce qui est cohérent avec son incorporation dans les tissus métastasés. Bien que l'édelfosine soit un inhibiteur de SK3 et qu'elle se soit incorporée dans les tissus métastasés (pattes, rachis et en plus faible quantité les poumons) comme l'Ohmline, l'édelfosine n'a pas eu d'effet sur le développement des métastases dans le modèle de xénogreffe. Ces résultats suggèrent que l'absence d'effet de l'édelfosine sur les métastases est due à ses effets non sélectifs (activation du récepteur au PAF, fixation sur le récepteur au LPA, inhibition des PKCs...). Par contre, cela n'explique pas pourquoi elle diminue le score métastatique dans le modèle d'injections intraveineuses de cellules cancéreuses.

Pour conclure, l'Ohmline s'est bien incorporée dans les tissus métastasés ce qui explique son effet sur le développement métastatique observé.

## C. Discussion

L'ensemble de ces expérimentations nous a permis de montrer dans un premier temps que l'Ohmline était utilisable *in vivo* sans causer d'effets délétères aux concentrations où nous l'avons testée. Nous avons par la suite montré que cet éther-lipide n'affectait pas le développement de la tumeur primaire bien qu'elle s'y incorpore. Enfin, nous avons mis en



évidence que l'Ohmline possède une activité anti-métastatique dans deux modèles murins de cancer métastatique et que son efficacité serait liée à son incorporation dans ces tissus.

Avant d'évaluer les effets d'un composé *in vivo*, il est habituel de tester sa toxicité. Dans le cas de l'Ohmline, cette étape n'a pas pu être réalisée parfaitement. En raison de problème de solubilité, nous avons dû d'emblée limiter la dose à 15 mg/kg. Nous avons pu constater qu'à cette concentration, l'Ohmline ne présentait pas de toxicité apparente. Il est également important de noter que l'absence de toxicité de l'Ohmline n'est pas due à un manque d'incorporation dans les tissus. Nous avons réalisé en parallèle les mêmes protocoles avec l'édelfosine et nous n'avons observé aucun effet toxique.

En raison du problème de solubilisation, il n'est pas possible de tester des concentrations plus élevées que 15 mg/kg par injection intraveineuse. Il serait donc nécessaire d'envisager de nouvelles stratégies. L'injection intra péritonéale permet une augmentation importante de la fraction de solvant (jusqu'à 50 %, 5 % maximum par voie intraveineuse) dans le volume injecté. Ceci nous permettrait de tester des concentrations plus élevées. D'autre part, il a été montré pour l'édelfosine que l'utilisation de liposomes permet d'augmenter son efficacité en majorant la dose injectée (Perkins, W. R. *et al.*, 1997). Cette solution est envisageable pour l'Ohmline en raison de sa structure lipidique et de ses similarités avec l'édelfosine.

Il est connu que les éther-lipides synthétiques et en particulier l'édelfosine vont produire leurs effets anti-tumoraux en s'incorporant dans les membranes cellulaires (Mollinedo, F. *et al.*, 1997). Il a également été décrit que l'édelfosine était fortement incorporée dans les tumeurs de modèles de leucémies chez la souris immunodéficiente (Mollinedo, F. *et al.*, 2010). Dans cette étude, il est précisé que l'édelfosine s'incorpore également dans divers organes comme le foie ou le cœur mais de manière moins importante que dans les cellules tumorales. Nos résultats montrent que l'Ohmline s'incorpore dans la tumeur primaire et dans différents organes. Nous avons observé que les sites préférentiels de l'incorporation de l'Ohmline (cerveau, cœur et estomac) étaient différents de ceux de l'édelfosine (cœur pour les souris non cancéreuses et cerveau pour les souris cancéreuses) dans les tissus murins. La biodistribution de l'édelfosine que nous avons montrée est concordante avec celle déjà décrite (Estella-Hermoso de Mendoza, A. *et al.*, 2009). Un point intéressant est que l'Ohmline s'incorpore dans le cerveau de façon nettement plus importante que l'édelfosine. Cela signifie que cette molécule passe la barrière hématoencéphalique (BHE). L'une des raisons pouvant expliquer cette différence est la présence du groupement phosphate sur l'édelfosine. Il a été montré que

la présence d'un groupement phosphate pouvait diminuer le transport au travers de la BHE (Fenart, L. *et al.*, 1999). La perspective de disposer d'un inhibiteur du canal SK3 franchissant la BHE, sachant que le canal SK3 est impliqué dans différentes pathologies neurologiques, semble donc intéressante (Bowen, T. *et al.*, 2001; Salthun-Lassalle, B. *et al.*, 2004; Fernandez de Sevilla, D. *et al.*, 2006).

L'incorporation de l'Ohmlin est variable entre les souris comme nous le montre l'assimilation des tumeurs primaires du modèle de xénogreffe. A l'avenir, il sera préférable de mesurer l'incorporation des éther-lipides dans les différents tissus (reins, poumons, estomac...) et pour chaque souris afin de déterminer des profils individuels. Ce phénomène est également observé pour l'édelfosine. L'origine de la différence d'incorporation n'est pas connue. Au niveau cellulaire, cette question a déjà attiré l'attention de plusieurs équipes pour comprendre comment l'édelfosine pouvait être incorporée différemment entre les cellules normales et les cellules cancéreuses (Gajate, C. *et al.*, 2002). Il a été émis plusieurs hypothèses comme une incorporation dans la membrane suivie d'un transport passif, l'endocytose, l'utilisation des flipases membranaires ou l'activité d'un transporteur spécifique. Nous avons observé que l'Ohmlin semble être plus incorporée dans les organes possédant un taux basal d'éther-lipides membranaires important (cœur, cerveau). La composition membranaire serait peut être un élément déterminant pour son incorporation. Si cet élément venait à être confirmé, il pourrait s'agir de l'un des mécanismes qui permet à l'Ohmlin d'agir sélectivement sur les cellules tumorales car il est admis que ces dernières présentent un taux d'éther-lipides dans leur membrane supérieur à celui des cellules non cancéreuses (Mangold, H. K. *et al.*, 1983). Par ailleurs, il serait intéressant de savoir si l'Ohmlin en s'incorporant dans les tissus augmente la quantité d'éther-lipides membranaires ou bien si elle se substitue à eux. Pour déterminer ce paramètre, il faudrait réaliser une analyse précise de la composition lipidique membranaire de cellules traitées ou non avec l'Ohmlin

Afin de déterminer les effets de l'Ohmlin sur le développement tumoral, nous avons évalué son activité dans un modèle murin de xénogreffe orthotopique. Bien que l'Ohmlin s'incorpore dans la tumeur primaire, elle n'affecte pas son développement à la concentration de 15 mg/kg. Il est intéressant de noter qu'à cette concentration, l'édelfosine n'a pas non plus d'effet sur le développement de la tumeur primaire alors qu'elle s'y incorpore aussi. Nous avons donc évalué l'activité de ces éther-lipides sur le développement des métastases. Dans le modèle de xénogreffe orthotopique, l'Ohmlin diminue significativement le score métastatique alors que l'édelfosine n'a pas d'effet. D'autre part dans le second modèle

d'injection intraveineuse de cellules cancéreuses (sans tumeur primaire), l'édelfosine présente une activité inhibitrice importante sur le développement des métastases, ce qui n'avait jamais été montré. L'absence d'effet de l'édelfosine sur les métastases du modèle de xénogreffe pourrait être due à des effets non sélectifs. En effet, elle pourrait agir sur différentes voies au niveau de la tumeur primaire via ses cibles non spécifiques observées *in vitro* : augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire en activant le récepteur au PAF, effets sur les PKCs. Ces effets non sélectifs pourraient favoriser le développement de métastases et annuler l'effet recherché sur le canal SK3. Dans le modèle de métastases expérimentales, son effet sur le canal SK3 pourrait l'emporter sur les effets non sélectifs. Le choix du modèle *in vivo* est donc très important.

Nous avons montré, *in vitro*, que l'Ohmlin inhibait spécifiquement la migration dépendante de SK3 des cellules MDA-MB-435s. L'implication de ce canal dans le développement tumoral est en cours d'étude au laboratoire (données non publiées). Il a déjà été montré que ce canal n'intervient pas dans le développement de la tumeur primaire ni dans le développement de métastases pulmonaires mais en revanche, il est impliqué dans la formation de métastases osseuses (données non publiées). Les mécanismes intervenant dans la formation de ces métastases osseuses sont en cours d'étude (Thèse de Lucie Clarysse). L'Ohmlin et l'édelfosine n'ont pas d'effet sur le développement de la tumeur primaire malgré leur incorporation. Ceci peut s'expliquer par l'absence de rôle du canal SK3 dans le développement de cette tumeur primaire. Les éther-lipides inhibent le canal SK3 qui ne régule pas le développement de la tumeur primaire. Dans les deux modèles utilisés, l'Ohmlin diminue le score métastatique des souris développant un cancer probablement en ralentissant le développement des métastases. Nous observons également une diminution du nombre de métastases osseuses en utilisant cet éther-lipide. Ces résultats suggèrent que c'est en inhibant le canal SK3 que l'Ohmlin a réduit le développement des métastases principalement osseuses. Néanmoins, nous avons observé un effet de l'Ohmlin sur les métastases pulmonaires. Cette donnée suggère que l'Ohmlin pourrait agir sur d'autres cibles que le canal SK3 impliquées dans la formation des métastases pulmonaires.

Nous avons montré que l'édelfosine n'a pas d'effet sur le développement de métastases dans le modèle de xénogreffe orthotopique, probablement en raison d'effets sur des cibles favorisant le développement des métastases et annulant l'effet sur le canal SK3. Par contre, cette molécule présente une activité anti-métastatique inattendue sur le modèle de « métastases expérimentales » : elle ralentit la croissance des métastases. Elle diminue le

nombre des métastases osseuses et pulmonaires. Ces effets peuvent s'expliquer par l'inhibition du canal SK3, la modulation d'autres cibles canalaire ou non et un effet antiprolifératif (pour la diminution de croissance des métastases).

Ces résultats indiquent que l'Ohmline est un composé lipidique anti métastatique prometteur et qui semble plus sélectif que l'édelfosine.

## **Conclusion**

## Conclusions

L'objectif de cette thèse était de déterminer les parties structurales de l'édelfosine nécessaires à l'inhibition du canal SK3 de manière à sélectionner des analogues moins toxiques sur les cellules non cancéreuses tout en conservant cette propriété inhibitrice du canal SK3.

Ainsi la molécule idéale pour inhiber le canal SK3 et la migration cellulaire doit être constituée d'un squelette glycérol uni par une liaison éther à une chaîne carbonée saturée ou non de 16 à 18 atomes de carbone en *sn*-1, un groupement méthoxy en *sn*-2 et une tête polaire en *sn*-3 qui peut être différente de la phosphocholine. Ces éléments nous ont permis de sélectionner l'Ohmline (1-O-Héxadécyl-2-O-Méthyl-*sn*-glycéro-Lactose) qui est un inhibiteur du canal SK3 présentant une sélectivité vis-à-vis des canaux SKCa et IKCa jamais encore observée. Cet éther-lipide n'a pas d'effet sur le développement de la tumeur primaire mais réduit le développement des métastases osseuses probablement en agissant sur le canal SK3.

Il serait intéressant de poursuivre des études pour la compréhension des mécanismes d'action de ce composé. Afin de confirmer l'interaction entre le canal SK3 et l'Ohmline, il serait possible en utilisant un canal SK3 couplé à la GFP et une molécule d'Ohmline marquée d'observer leur co-localisation au niveau membranaire. Nous avons commencé à évaluer des analogues fluorescents de l'Ohmline mais les modifications testées ont entraîné la perte de leur activité inhibitrice du canal SK3. De plus, en utilisant ces outils, il serait possible de déterminer si l'interaction se réalise au niveau du front de migration ou à l'arrière de la cellule.

D'autre part, l'Ohmline modifie la sensibilité vis-à-vis du  $\text{Ca}^{2+}$  du canal SK3. Pour montrer par quel mécanisme l'Ohmline modifie ce paramètre, il serait possible en réalisant des expériences de patch clamp en configuration « Inside-out » d'observer comment varie la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  en présence d'Ohmline. Il serait également important de voir quel est l'effet de l'Ohmline sur la concentration calcique intracellulaire et sur les voies calciques en générales de cellules traitées avec cet éther-lipide.

L'Ohmline agit sur le canal SK3 par un site différent de celui de l'apamine. Il serait intéressant de déterminer quelles sont les parties du canal impliquées dans l'interaction. La diminution de la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  du canal suggère que l'Ohmline pourrait interagir avec l'extrémité C-terminale du canal et probablement avec la calmoduline. Des réponses à cette question pourraient être apportées en réalisant des expériences de mutagenèse dirigée pour ces

régions ou bien par la construction de chimères entre le canal IKCa et le canal SK3 (en raison de la différence de sensibilité à l'Ohmlin).

L'Ohmlin pourrait être le premier membre d'une famille d'agents anti-métastatiques lipidiques mais pour cela il est nécessaire de mieux comprendre par quels mécanismes l'Ohmlin réduit le développement des métastases pulmonaires en particulier dans les modèles de cancers métastatiques. Il serait nécessaire de confirmer si les effets sur le développement des métastases osseuses sont dépendants du canal SK3 et de comprendre comment son incorporation dans les tissus influence son activité anti-métastatique. Pour cela, il est possible de réaliser des expériences avec les cellules SK3- et de reproduire les mesures de la quantité d'incorporation pour des profils individuels.

Il serait également intéressant d'évaluer les effets de l'Ohmlin quand elle est apportée par voie orale. L'utilisation de ce mode d'administration, déjà montré comme efficace avec l'édelfosine, permettrait peut être d'augmenter les concentrations afin de majorer l'effet sur les métastases.

Lors de la détermination des éléments structuraux nécessaires à l'inhibition du canal SK3 et de la sélection de l'Ohmlin, de façon inattendue, nous avons obtenu un activateur du canal SK3 en modifiant le groupement méthoxy situé en *sn*-2 de l'édelfosine. La possibilité d'obtenir des composés activateurs du canal SK3 est très intéressante. Tout le travail sur cet analogue reste à faire.

## Bibliographie



## Ouvrages imprimés

MANGOLD, HK. PALTAUF, F. *ETHER LIPIDS Biochemical and biomédical aspects*. Academic Press, 1983, ISBN 0-12-468780-6.

MILO, G.E.. SCHULER, C.F.. *Transformation of human épithélial cells*. CRC Press, 1992.

## Travaux universitaires

BIDARD, Francois-Clément. *Interactions et coopérations cellulaires dans le processus métastatique*. Thèse de doctorat, Université Paris XI, 22 septembre 2008, 136 p.

POTIER, Marie. *Rôle des canaux potassiques activés par le calcium et sensibles aux lipides dans la migration des cellules cancéreuses*. Thèse de doctorat, Université Francois-Rabelais Tours, 5 décembre 2006, 224 p.

## Sites web consultés

HUGO Gene Nomenclature Committee. [Référence du 05 février 2011], <http://www.genenames.org/>

The International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [Référence du 09 février 2011], <http://www.iuphar.org/>

Uniprot. [Référence du 22 février 2011], <http://www.uniprot.org/>

Institut National du Cancer. [Référence du 15 mars 2011], <http://www.e-cancer.fr/>

Cancer Info. [Référence du 28 mars 2011], <http://www.e-cancer.fr/cancer-info>

Servier Médical Art. [Référence du 11 avril 2011], <http://www.servier.fr/servier-medical-art/banque-dimages-powerpoint>

Nomenclature of the potassium channel superfamily. [Référence du 13 avril 2011], <http://www.ipmc.cnrs.fr/~duprat/ipmc/nomenclature.htm#debut>

## Publications internationales

Abdel-Ghany, M., H. C. Cheng, *et al.* (2001). "The breast cancer beta 4 integrin and endothelial human CLCA2 mediate lung metastasis." *J Biol Chem* **276**(27): 25438-46.

Absi, M., M. P. Burnham, *et al.* (2007). "Effects of methyl beta-cyclodextrin on EDHF responses in pig and rat arteries; association between SK(Ca) channels and caveolin-rich domains." *Br J Pharmacol* **151**(3): 332-40.

Aft, R. (2011). "Bisphosphonates in breast cancer: clinical activity and implications of preclinical data." *Clin Adv Hematol Oncol* **9**(3): 194-205.

Ahmad, I., J. J. Filep, *et al.* (1997). "Enhanced therapeutic effects of liposome-associated 1-O-octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphocholine." *Cancer Res* **57**(10): 1915-21.

Ahrne, L., L. Bjorck, *et al.* (1982). "Incorporation of dietary 1-O-alkyldiacyl glycerols into tissue lipids of neonatal rats." *Ann Nutr Metab* **26**(3): 162-70.

Allen, D., B. Fakler, *et al.* (2007). "Organization and regulation of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel multiprotein complexes." *J Neurosci* **27**(9): 2369-76.

Alonso, M. T., C. Gajate, *et al.* (1997). "Dissociation of the effects of the antitumour ether lipid ET-18-OCH<sub>3</sub> on cytosolic calcium and on apoptosis." *Br J Pharmacol* **121**(7): 1364-8.

Altankov, G. and F. Grinnell (1993). "Depletion of intracellular potassium disrupts coated pits and reversibly inhibits cell polarization during fibroblast spreading." *J Cell Biol* **120**(6): 1449-59.

- Alvarez, J., M. Montero, *et al.* (1992). "High affinity inhibition of Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> channels by cytochrome P-450 inhibitors." *J Biol Chem* **267**(17): 11789-93.
- Alvina, K. and K. Khodakhah (2010). "KCa channels as therapeutic targets in episodic ataxia type-2." *J Neurosci* **30**(21): 7249-57.
- Andreesen, R., M. Modolell, *et al.* (1978). "Selective destruction of human leukemic cells by alkyl-lysophospholipids." *Cancer Res* **38**(11 Pt 1): 3894-9.
- Andreotti, N., E. di Luccio, *et al.* (2005). "Molecular modeling and docking simulations of scorpion toxins and related analogs on human SKCa2 and SKCa3 channels." *Peptides* **26**(7): 1095-108.
- Andres, M. A., N. C. Baptista, *et al.* (2009). "Depletion of SK1 channel subunits leads to constitutive insulin secretion." *FEBS Lett* **583**(2): 369-76.
- Antonarakis, S. E., J. L. Blouin, *et al.* (1999). "Lack of linkage or association between schizophrenia and the polymorphic trinucleotide repeat within the KCNN3 gene on chromosome 1q21." *Am J Med Genet* **88**(4): 348-51.
- Arcangeli, A., O. Crociani, *et al.* (2009). "Targeting ion channels in cancer: a novel frontier in antineoplastic therapy." *Curr Med Chem* **16**(1): 66-93.
- Armisen, R., K. Marcelain, *et al.* (2011). "TRPM4 enhances cell proliferation through up-regulation of the beta-catenin signaling pathway." *J Cell Physiol* **226**(1): 103-9.
- Ashcroft, F. M. and P. Rorsman (1989). "Electrophysiology of the pancreatic beta-cell." *Prog Biophys Mol Biol* **54**(2): 87-143.
- Babu, Y. S., J. S. Sack, *et al.* (1985). "Three-dimensional structure of calmodulin." *Nature* **315**(6014): 37-40.
- Bahia, P. K., R. Suzuki, *et al.* (2005). "A functional role for small-conductance calcium-activated potassium channels in sensory pathways including nociceptive processes." *J Neurosci* **25**(14): 3489-98.
- Barfod, E. T., A. L. Moore, *et al.* (2001). "Cloning and functional expression of a liver isoform of the small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel SK3." *Am J Physiol Cell Physiol* **280**(4): C836-42.
- Barfod, E. T., A. L. Moore, *et al.* (2007). "Ca<sup>2+</sup>-activated IK1 channels associate with lipid rafts upon cell swelling and mediate volume recovery." *J Biol Chem* **282**(12): 8984-93.
- Barrientos, S., O. Stojadinovic, *et al.* (2008). "Growth factors and cytokines in wound healing." *Wound Repair Regen* **16**(5): 585-601.
- Begenisich, T., T. Nakamoto, *et al.* (2004). "Physiological roles of the intermediate conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel Kcnn4." *J Biol Chem* **279**(46): 47681-7.
- Beneteau, M., M. Pizon, *et al.* (2008). "Localization of Fas/CD95 into the lipid rafts on down-modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway." *Mol Cancer Res* **6**(4): 604-13.
- Benton, D. C., A. S. Monaghan, *et al.* (2003). "Small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels formed by the expression of rat SK1 and SK2 genes in HEK 293 cells." *J Physiol* **553**(Pt 1): 13-9.
- Benveniste, J. (1974). "Platelet-activating factor, a new mediator of anaphylaxis and immune complex deposition from rabbit and human basophils." *Nature* **249**(457): 581-2.
- Benveniste, J., P. M. Henson, *et al.* (1972). "Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor." *J Exp Med* **136**(6): 1356-77.
- Berdel, W. E., U. Fink, *et al.* (1982). "Response of acute myelomonocytic leukemia to alkyl-lysophospholipids. A case report." *Blut* **44**(3): 177-86.

- Berdel, W. E., U. Fink, *et al.* (1987). "Clinical phase I pilot study of the alkyl lysophospholipid derivative ET-18-OCH<sub>3</sub>." *Lipids* **22**(11): 967-9.
- Berdel, W. E., H. Schlehe, *et al.* (1982). "Early tumor and leukemia response to alkyllysophospholipids in a phase I study." *Cancer* **50**(10): 2011-5.
- Berkovic, D., K. Berkovic, *et al.* (1994). "Inhibition of calcium-dependent protein kinase C by hexadecylphosphocholine and 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine do not correlate with inhibition of proliferation of HL60 and K562 cell lines." *Eur J Cancer* **30A**(4): 509-15.
- Besson, P., J. Gore, *et al.* (1996). "Inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activity by an alkyl-lysophospholipid analogue in a human breast cancer cell line." *Biochem Pharmacol* **51**(9): 1153-8.
- Bildl, W., T. Strassmaier, *et al.* (2004). "Protein kinase CK2 is coassembled with small conductance Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels and regulates channel gating." *Neuron* **43**(6): 847-58.
- Blank, M. L., E. A. Cress, *et al.* (1991). "Dietary supplementation with ether-linked lipids and tissue lipid composition." *Lipids* **26**(2): 166-9.
- Blank, T., I. Nijholt, *et al.* (2003). "Small-conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel SK3 generates age-related memory and LTP deficits." *Nat Neurosci* **6**(9): 911-2.
- Boettger, M. K., S. Till, *et al.* (2002). "Calcium-activated potassium channel SK1- and IK1-like immunoreactivity in injured human sensory neurones and its regulation by neurotrophic factors." *Brain* **125**(Pt 2): 252-63.
- Boggs, K. P., C. O. Rock, *et al.* (1995). "Lysophosphatidylcholine and 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine inhibit the CDP-choline pathway of phosphatidylcholine synthesis at the CTP:phosphocholine cytidylyltransferase step." *J Biol Chem* **270**(13): 7757-64.
- Bolscher, J. G., D. C. Schallier, *et al.* (1988). "Modification of cell surface carbohydrates and invasive behavior by an alkyl lysophospholipid." *Cancer Res* **48**(4): 977-82.
- Bond, C. T., R. Sprengel, *et al.* (2000). "Respiration and parturition affected by conditional overexpression of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel subunit, SK3." *Science* **289**(5486): 1942-6.
- Bonnet-Brilhault, F., C. Laurent, *et al.* (1999). "No evidence for involvement of KCNN3 (hSKCa3) potassium channel gene in familial and isolated cases of schizophrenia." *Eur J Hum Genet* **7**(2): 247-50.
- Bos, P. D., X. H. Zhang, *et al.* (2009). "Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain." *Nature* **459**(7249): 1005-9.
- Bosch, M. A., M. J. Kelly, *et al.* (2002). "Distribution, neuronal colocalization, and 17beta-E2 modulation of small conductance calcium-activated K(+) channel (SK3) mRNA in the guinea pig brain." *Endocrinology* **143**(3): 1097-107.
- Bourgain, R. H., R. Andries, *et al.* (1992). "PAF-acether induced arterial thrombosis and the effect of specific antagonists." *Adv Exp Med Biol* **316**: 427-40.
- Bowen, T., N. Williams, *et al.* (2001). "Mutation screening of the KCNN3 gene reveals a rare frameshift mutation." *Mol Psychiatry* **6**(3): 259-60.
- Brady, C. A. and L. D. Attardi (2010). "p53 at a glance." *J Cell Sci* **123**(Pt 15): 2527-32.
- Brahler, S., A. Kaistha, *et al.* (2009). "Genetic deficit of SK3 and IK1 channels disrupts the endothelium-derived hyperpolarizing factor vasodilator pathway and causes hypertension." *Circulation* **119**(17): 2323-32.
- Brightling, C. E., D. Kaur, *et al.* (2005). "Differential expression of CCR3 and CXCR3 by human lung and bone marrow-derived mast cells: implications for tissue mast cell migration." *J Leukoc Biol* **77**(5): 759-66.

- Bringuier, P. P., R. Umbas, *et al.* (1993). "Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors." *Cancer Res* **53**(14): 3241-5.
- Brohult, A. (1958). "Effects of alkoxyglycerols and especially selachyl alcohol on the bone marrow in connexion with irradiation treatment and in leukaemia therapy." *Nature* **181**(4621): 1484-5.
- Brohult, A., J. Brohult, *et al.* (1978). "Regression of tumour growth after administration of alkoxyglycerols." *Acta Obstet Gynecol Scand* **57**(1): 79-83.
- Brohult, A., J. Brohult, *et al.* (1986). "Reduced mortality in cancer patients after administration of alkoxyglycerols." *Acta Obstet Gynecol Scand* **65**(7): 779-85.
- Brouard, T. and A. Chantôme (2009). "Automatic nuclei cell counting in low-resolution fluorescence images." *Computational Vision and Medical Image Processing CRC Press*: 83-88.
- Brown, D. M. and E. Ruoslahti (2004). "Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis." *Cancer Cell* **5**(4): 365-74.
- Bruyneel, E. A., G. A. Storme, *et al.* (1993). "Evidence for abrogation of oncogene-induced radioresistance of mammary cancer cells by hexadecylphosphocholine in vitro." *Eur J Cancer* **29A**(14): 1958-63.
- Bunn, H. F. (1997). "Pathogenesis and treatment of sickle cell disease." *N Engl J Med* **337**(11): 762-9.
- Burnham, M. P., R. Bychkov, *et al.* (2002). "Characterization of an apamin-sensitive small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel in porcine coronary artery endothelium: relevance to EDHF." *Br J Pharmacol* **135**(5): 1133-43.
- Cailleau, R., M. Olive, *et al.* (1978). "Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization." *In Vitro* **14**(11): 911-5.
- Campos Rosa, J., D. Galanakis, *et al.* (2000). "Synthesis, molecular modeling, and pharmacological testing of bis-quinolinium cyclophanes: potent, non-peptidic blockers of the apamin-sensitive Ca(2+)-activated K(+) channel." *J Med Chem* **43**(3): 420-31.
- Candal, F. J., D. C. Bosse, *et al.* (1994). "Inhibition of induced angiogenesis in a human microvascular endothelial cell line by ET-18-OCH<sub>3</sub>." *Cancer Chemother Pharmacol* **34**(2): 175-8.
- Cao, Y. J., J. C. Dreixler, *et al.* (2002). "Modulation of recombinant and native neuronal SK channels by the neuroprotective drug riluzole." *Eur J Pharmacol* **449**(1-2): 47-54.
- Carragher, N. O. and M. C. Frame (2002). "Calpain: a role in cell transformation and migration." *Int J Biochem Cell Biol* **34**(12): 1539-43.
- Castle, N. A., D. G. Haylett, *et al.* (1993). "Dequalinium: a potent inhibitor of apamin-sensitive K<sup>+</sup> channels in hepatocytes and of nicotinic responses in skeletal muscle." *Eur J Pharmacol* **236**(2): 201-7.
- Castle, N. A., D. O. London, *et al.* (2003). "Maurotoxin: a potent inhibitor of intermediate conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels." *Mol Pharmacol* **63**(2): 409-18.
- Castronovo, V. (2003). "[Nutrition and cancer]." *Rev Med Liege* **58**(4): 231-9.
- Chambers, A. F., A. C. Groom, *et al.* (2002). "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites." *Nat Rev Cancer* **2**(8): 563-72.
- Chandy, K. G., E. Fantino, *et al.* (1998). "Isolation of a novel potassium channel gene hSKCa3 containing a polymorphic CAG repeat: a candidate for schizophrenia and bipolar disorder?" *Mol Psychiatry* **3**(1): 32-7.
- Chandy, K. G., H. Wulff, *et al.* (2004). "K<sup>+</sup> channels as targets for specific immunomodulation." *Trends Pharmacol Sci* **25**(5): 280-9.
- Chantome, A., A. Girault, *et al.* (2009). "KCa2.3 channel-dependent hyperpolarization increases melanoma cell motility." *Exp Cell Res* **315**(20): 3620-30.

- Cheminade, C., V. Gautier, *et al.* (2002). "1-O-alkylglycerols improve boar sperm motility and fertility." *Biol Reprod* **66**(2): 421-8.
- Chen, M. X., S. A. Gorman, *et al.* (2004). "Small and intermediate conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels confer distinctive patterns of distribution in human tissues and differential cellular localisation in the colon and corpus cavernosum." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**(6): 602-15.
- Christophersen, P. (1991). " $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel from human erythrocyte membranes: single channel rectification and selectivity." *J Membr Biol* **119**(1): 75-83.
- Chua, S. K., P. C. Chang, *et al.* (2011). "Small-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel and Recurrent Ventricular Fibrillation in Failing Rabbit Ventricles." *Circ Res* **108**(8): 971-979.
- Cohen, A., Y. Ben-Abu, *et al.* (2008). "A novel mechanism for human  $\text{K}^{+}$  channel gating. Facilitation of C-type gating by protonation of extracellular histidine residues." *J Biol Chem* **283**(28): 19448-55.
- Coleman, R., R. Cook, *et al.* (2011). "Zoledronic acid use in cancer patients: more than just supportive care?" *Cancer* **117**(1): 11-23.
- Conesa-Zamora, P., F. Mollinedo, *et al.* (2005). "A comparative study of the effect of the antineoplastic ether lipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-glycero-3-phosphocholine and some homologous compounds on PKC  $\alpha$  and PKC  $\epsilon$ ." *Biochim Biophys Acta* **1687**(1-3): 110-9.
- Cruse, G., S. M. Duffy, *et al.* (2006). "Functional  $\text{KCa}_{3.1}$   $\text{K}^{+}$  channels are required for human lung mast cell migration." *Thorax* **61**(10): 880-5.
- Cui, Z., M. Houweling, *et al.* (1996). "A genetic defect in phosphatidylcholine biosynthesis triggers apoptosis in Chinese hamster ovary cells." *J Biol Chem* **271**(25): 14668-71.
- D'Hoedt, D., K. Hirzel, *et al.* (2004). "Domain analysis of the calcium-activated potassium channel SK1 from rat brain. Functional expression and toxin sensitivity." *J Biol Chem* **279**(13): 12088-92.
- Danker, K., W. Reutter, *et al.* (2010). "Glycosidated phospholipids: uncoupling of signalling pathways at the plasma membrane." *Br J Pharmacol* **160**(1): 36-47.
- Das, A. K., R. D. Holmes, *et al.* (1992). "Dietary ether lipid incorporation into tissue plasmalogens of humans and rodents." *Lipids* **27**(6): 401-5.
- Day, L. J., K. L. Schaa, *et al.* (2011). "Single-Nucleotide Polymorphisms in the KCNN3 Gene Associate With Preterm Birth." *Reprod Sci* **18**(3): 286-95.
- Decimo, I., R. Roncarati, *et al.* (2006). "SK3 trafficking in hippocampal cells: the role of different molecular domains." *Biosci Rep* **26**(6): 399-412.
- Demopoulos, C. A., R. N. Pinckard, *et al.* (1979). "Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators)." *J Biol Chem* **254**(19): 9355-8.
- Desai, R., A. Peretz, *et al.* (2000). " $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels in human leukemic Jurkat T cells. Molecular cloning, biochemical and functional characterization." *J Biol Chem* **275**(51): 39954-63.
- Devor, D. C. and R. A. Frizzell (1998). "Modulation of  $\text{K}^{+}$  channels by arachidonic acid in T84 cells. I. Inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^{+}$  channel." *Am J Physiol* **274**(1 Pt 1): C138-48.
- Devor, D. C., A. K. Singh, *et al.* (1999). "Bicarbonate and chloride secretion in Calu-3 human airway epithelial cells." *J Gen Physiol* **113**(5): 743-60.
- Di, L., S. Srivastava, *et al.* (2010). "Nucleoside diphosphate kinase B knock-out mice have impaired activation of the  $\text{K}^{+}$  channel  $\text{KCa}_{3.1}$ , resulting in defective T cell activation." *J Biol Chem* **285**(50): 38765-71.

- Diagne, A., J. Fauvel, *et al.* (1984). "Studies on ether phospholipids. II. Comparative composition of various tissues from human, rat and guinea pig." *Biochim Biophys Acta* **793**(2): 221-31.
- Ding, H., M. Hashem, *et al.* (2005). "Endothelial dysfunction in the streptozotocin-induced diabetic apoE-deficient mouse." *Br J Pharmacol* **146**(8): 1110-8.
- Doyle, D. A., J. Morais Cabral, *et al.* (1998). "The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity." *Science* **280**(5360): 69-77.
- Drings, P., I. Gunther, *et al.* (1992). "Final Evaluation of a phase II study on the effect of edelfosine (an ether lipid) in advanced non-small-cell bronchogenic carcinoma." *Onkologie* **15**(5): 375-382.
- Duclos, R. I., Jr., H. H. Chia, *et al.* (1994). "Syntheses of racemic and nearly optically pure ether lipids and evaluation of in vitro antineoplastic activities." *J Med Chem* **37**(24): 4147-54.
- Eibl, H., D. Arnold, *et al.* (1967). "[On the synthesis of alpha and beta lecithins and their ether analogs]." *Justus Liebigs Ann Chem* **709**: 226-30.
- Eichler, I., J. Wibawa, *et al.* (2003). "Selective blockade of endothelial Ca<sup>2+</sup>-activated small- and intermediate-conductance K<sup>+</sup>-channels suppresses EDHF-mediated vasodilation." *Br J Pharmacol* **138**(4): 594-601.
- Ellinor, P. T., K. L. Lunetta, *et al.* (2010). "Common variants in KCNN3 are associated with lone atrial fibrillation." *Nat Genet* **42**(3): 240-4.
- Engelbraaten, O., R. Bjerkvig, *et al.* (1991). "Effect of alkyl-lysophospholipid on glioblastoma cell invasion into fetal rat brain tissue in vitro." *Cancer Res* **51**(6): 1713-9.
- Estella-Hermoso de Mendoza, A., M. A. Campanero, *et al.* (2009). "Antitumor alkyl ether lipid edelfosine: tissue distribution and pharmacokinetic behavior in healthy and tumor-bearing immunosuppressed mice." *Clin Cancer Res* **15**(3): 858-64.
- Evans, R. W., D. E. Weaver, *et al.* (1980). "Diacyl, alkenyl, and alkyl ether phospholipids in ejaculated, in utero-, and in vitro-incubated porcine spermatozoa." *J Lipid Res* **21**(2): 223-8.
- Faber, E. S. (2009). "Functions and modulation of neuronal SK channels." *Cell Biochem Biophys* **55**(3): 127-39.
- Fakler, B. and J. P. Adelman (2008). "Control of K(Ca) channels by calcium nano/microdomains." *Neuron* **59**(6): 873-81.
- Fanger, C. M., S. Ghanshani, *et al.* (1999). "Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1." *J Biol Chem* **274**(9): 5746-54.
- Farber, E. (1984). "The multistep nature of cancer development." *Cancer Res* **44**(10): 4217-23.
- Fenart, L., A. Casanova, *et al.* (1999). "Evaluation of effect of charge and lipid coating on ability of 60-nm nanoparticles to cross an in vitro model of the blood-brain barrier." *J Pharmacol Exp Ther* **291**(3): 1017-22.
- Feng, J., Y. Liu, *et al.* (2008). "Calcium-activated potassium channels contribute to human coronary microvascular dysfunction after cardioplegic arrest." *Circulation* **118**(14 Suppl): S46-51.
- Fernandez de Sevilla, D., J. Garduno, *et al.* (2006). "Calcium-activated afterhyperpolarizations regulate synchronization and timing of epileptiform bursts in hippocampal CA3 pyramidal neurons." *J Neurophysiol* **96**(6): 3028-41.
- Feske, S., Y. Gwack, *et al.* (2006). "A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function." *Nature* **441**(7090): 179-85.
- Fioretti, B., E. Castigli, *et al.* (2004). "NPPB block of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel." *Eur J Pharmacol* **497**(1): 1-6.

- Fischer, A., D. Muller, *et al.* (2006). "The ether lipid inositol-C2-PAF is a potent inhibitor of cell proliferation in HaCaT cells." *Chembiochem* **7**(3): 441-9.
- Folch, J., M. Lees, *et al.* (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." *J Biol Chem* **226**(1): 497-509.
- Forest, V., M. Clement, *et al.* (2003). "Butyrate restores motile function and actin cytoskeletal network integrity in apc mutated mouse colon epithelial cells." *Nutr Cancer* **45**(1): 84-92.
- Fournier, C., S. Kourrich, *et al.* (2001). "Apamin improves reference memory but not procedural memory in rats by blocking small conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in an olfactory discrimination task." *Behav Brain Res* **121**(1-2): 81-93.
- Fraser, S. P. and L. A. Pardo (2008). "Ion channels: functional expression and therapeutic potential in cancer. Colloquium on Ion Channels and Cancer." *EMBO Rep* **9**(6): 512-5.
- Friedl, P. and K. Wolf (2010). "Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model." *J Cell Biol* **188**(1): 11-9.
- Frixen, U. H., J. Behrens, *et al.* (1991). "E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells." *J Cell Biol* **113**(1): 173-85.
- Fujita, A., T. Takeuchi, *et al.* (2003). "Localization of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, SK3, in fibroblast-like cells forming gap junctions with smooth muscle cells in the mouse small intestine." *J Pharmacol Sci* **92**(1): 35-42.
- Fujita, A., T. Takeuchi, *et al.* (2001). "Expression of Ca(2+)-activated K(+) channels, SK3, in the interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract." *Am J Physiol Cell Physiol* **281**(5): C1727-33.
- Gajate, C., F. Gonzalez-Camacho, *et al.* (2009). "Involvement of raft aggregates enriched in Fas/CD95 death-inducing signaling complex in the antileukemic action of edelfosine in Jurkat cells." *PLoS One* **4**(4): e5044.
- Gajate, C. and F. Mollinedo (2002). "Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH(3) (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells." *Curr Drug Metab* **3**(5): 491-525.
- Galarra, E., C. Vilchis, *et al.* (2007). "Somatostatinergic modulation of firing pattern and calcium-activated potassium currents in medium spiny neostriatal neurons." *Neuroscience* **146**(2): 537-54.
- Gamallo, C., J. Palacios, *et al.* (1993). "Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma." *Am J Pathol* **142**(4): 987-93.
- Gandolfo, G., H. Schweitz, *et al.* (1996). "Sleep cycle disturbances induced by apamin, a selective blocker of Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels." *Brain Res* **736**(1-2): 344-7.
- Gao, Y., C. M. Balut, *et al.* (2010). "Recycling of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, KCa2.3, is dependent upon RME-1, Rab35/EPI64C, and an N-terminal domain." *J Biol Chem* **285**(23): 17938-53.
- Gao, Y., C. K. Chotoo, *et al.* (2008). "Role of S3 and S4 transmembrane domain charged amino acids in channel biogenesis and gating of KCa2.3 and KCa3.1." *J Biol Chem* **283**(14): 9049-59.
- Gardos, G. (1958). "The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes." *Biochim Biophys Acta* **30**(3): 653-4.
- Gay, L. J. and B. Felding-Habermann (2011). "Contribution of platelets to tumour metastasis." *Nat Rev Cancer* **11**(2): 123-34.
- Gerlach, A. C., N. N. Gangopadhyay, *et al.* (2000). "Kinase-dependent regulation of the intermediate conductance, calcium-dependent potassium channel, hIK1." *J Biol Chem* **275**(1): 585-98.

- Gerlach, A. C., C. A. Syme, *et al.* (2001). "ATP-dependent activation of the intermediate conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, hIK1, is conferred by a C-terminal domain." *J Biol Chem* **276**(24): 10963-70.
- Gessner, G., K. Schonherr, *et al.* (2005). "BKCa channels activating at resting potential without calcium in LNCaP prostate cancer cells." *J Membr Biol* **208**(3): 229-40.
- Ghanshani, S., M. Coleman, *et al.* (1998). "Human calcium-activated potassium channel gene KCNN4 maps to chromosome 19q13.2 in the region deleted in diamond-blackfan anemia." *Genomics* **51**(1): 160-1.
- Ghanshani, S., H. Wulff, *et al.* (2000). "Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences." *J Biol Chem* **275**(47): 37137-49.
- Giachini, F. R., F. S. Carneiro, *et al.* (2009). "Upregulation of intermediate calcium-activated potassium channels counterbalance the impaired endothelium-dependent vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats." *Transl Res* **154**(4): 183-93.
- Gilon, P., R. M. Shepherd, *et al.* (1993). "Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> as evidences in single pancreatic islets." *J Biol Chem* **268**(30): 22265-8.
- Goldstein, R. H., M. R. Reagan, *et al.* (2010). "Human bone marrow-derived MSCs can home to orthotopic breast cancer tumors and promote bone metastasis." *Cancer Res* **70**(24): 10044-50.
- Goodchild, S. J., C. Lamy, *et al.* (2009). "Inhibition of K(Ca)<sub>2.2</sub> and K(Ca)<sub>2.3</sub> channel currents by protonation of outer pore histidine residues." *J Gen Physiol* **134**(4): 295-308.
- Gorgas, K., A. Teigler, *et al.* (2006). "The ether lipid-deficient mouse: tracking down plasmalogen functions." *Biochim Biophys Acta* **1763**(12): 1511-26.
- Grgic, I., B. P. Kaistha, *et al.* (2009). "Endothelial Ca<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in normal and impaired EDHF-dilator responses--relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery." *Br J Pharmacol* **157**(4): 509-26.
- Grosman, N. (2001). "Similar effects of ether phospholipids, PAF and lyso-PAF on the Ca(2+)-ATPase activity of rat brain synaptosomes and leukocyte membranes." *Int Immunopharmacol* **1**(7): 1321-9.
- Guivisdalsky, P. N., R. Bittman, *et al.* (1990). "Synthesis and antineoplastic properties of ether-linked thioglycolipids." *J Med Chem* **33**(9): 2614-21.
- Gutman, G. A., K. G. Chandy, *et al.* (2003). "International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels." *Pharmacol Rev* **55**(4): 583-6.
- Habermann, E. (1984). "Apamin." *Pharmacol Ther* **25**(2): 255-70.
- Hahn, K., R. DeBiasio, *et al.* (1992). "Patterns of elevated free calcium and calmodulin activation in living cells." *Nature* **359**(6397): 736-8.
- Hallworth, N. E., C. J. Wilson, *et al.* (2003). "Apamin-sensitive small conductance calcium-activated potassium channels, through their selective coupling to voltage-gated calcium channels, are critical determinants of the precision, pace, and pattern of action potential generation in rat subthalamic nucleus neurons in vitro." *J Neurosci* **23**(20): 7525-42.
- Hamill, O. P., A. Marty, *et al.* (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." *Pflugers Arch* **391**(2): 85-100.
- Hamilton, K. L., L. Meads, *et al.* (1999). "1-EBIO stimulates Cl<sup>-</sup> secretion by activating a basolateral K<sup>+</sup> channel in the mouse jejunum." *Pflugers Arch* **439**(1-2): 158-66.



- Hamilton, K. L., C. A. Syme, *et al.* (2003). "Molecular localization of the inhibitory arachidonic acid binding site to the pore of hIK1." *J Biol Chem* **278**(19): 16690-7.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-74.
- Hardman, W. E., C. J. Barnes, *et al.* (1997). "Effects of iron supplementation and ET-18-OCH<sub>3</sub> on MDA-MB 231 breast carcinomas in nude mice consuming a fish oil diet." *Br J Cancer* **76**(3): 347-54.
- Harmar, A. J., R. A. Hills, *et al.* (2009). "IUPHAR-DB: the IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels." *Nucleic Acids Res* **37**(Database issue): D680-5.
- Harris, C. C. (1991). "Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s." *Cancer Res* **51**(18 Suppl): 5023s-5044s.
- Haugland, H. K., S. J. Nygaard, *et al.* (1999). "Combined effect of alkyl-lysophospholipid and vincristine on proliferation, migration and invasion in human glioma cell lines in vitro." *Anticancer Res* **19**(1A): 149-56.
- Heesbeen, E. C., L. F. Verdonck, *et al.* (1991). "Alkyllysophospholipid ET-18-OCH<sub>3</sub> acts as an activator of protein kinase C in HL-60 cells." *FEBS Lett* **290**(1-2): 231-4.
- Heginbotham, L., Z. Lu, *et al.* (1994). "Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence." *Biophys J* **66**(4): 1061-7.
- Herrera, G. M., M. J. Pozo, *et al.* (2003). "Urinary bladder instability induced by selective suppression of the murine small conductance calcium-activated potassium (SK3) channel." *J Physiol* **551**(Pt 3): 893-903.
- Heymans, F., C. Da Silva, *et al.* (1987). "Alkyl analogs of diacylglycerol as activators of protein kinase C." *FEBS Lett* **218**(1): 35-40.
- Hichami, A., V. Duroudier, *et al.* (1997). "Modulation of platelet-activating-factor production by incorporation of naturally occurring 1-O-alkylglycerols in phospholipids of human leukemic monocyte-like THP-1 cells." *Eur J Biochem* **250**(2): 242-8.
- Hilgers, R. H. and R. C. Webb (2007). "Reduced expression of SKCa and IKCa channel proteins in rat small mesenteric arteries during angiotensin II-induced hypertension." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**(5): H2275-84.
- Hirschberg, B., J. Maylie, *et al.* (1998). "Gating of recombinant small-conductance Ca-activated K<sup>+</sup> channels by calcium." *J Gen Physiol* **111**(4): 565-81.
- Hirschberg, B., J. Maylie, *et al.* (1999). "Gating properties of single SK channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons." *Biophys J* **77**(4): 1905-13.
- Hodgson, L. and C. Dong (2001). "[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> as a potential downregulator of alpha2beta1-integrin-mediated A2058 tumor cell migration to type IV collagen." *Am J Physiol Cell Physiol* **281**(1): C106-13.
- Hodivala-Dilke, K. M., A. R. Reynolds, *et al.* (2003). "Integrins in angiogenesis: multitasking molecules in a balancing act." *Cell Tissue Res* **314**(1): 131-44.
- Horn, R. and A. Marty (1988). "Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method." *J Gen Physiol* **92**(2): 145-59.
- Hosseini, R., D. C. Benton, *et al.* (2001). "SK3 is an important component of K(+) channels mediating the afterhyperpolarization in cultured rat SCG neurones." *J Physiol* **535**(Pt 2): 323-34.
- Hougaard, C., B. L. Eriksen, *et al.* (2007). "Selective positive modulation of the SK3 and SK2 subtypes of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels." *Br J Pharmacol* **151**(5): 655-65.
- Hu, G., Y. Kang, *et al.* (2009). "From breast to the brain: unraveling the puzzle of metastasis organotropism." *J Mol Cell Biol* **1**(1): 3-5.

- Hugues, M., G. Romey, *et al.* (1982). "Apamin as a selective blocker of the calcium-dependent potassium channel in neuroblastoma cells: voltage-clamp and biochemical characterization of the toxin receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(4): 1308-12.
- Huttenlocher, A., S. P. Palecek, *et al.* (1997). "Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain." *J Biol Chem* **272**(52): 32719-22.
- Ishii, T. M., J. Maylie, *et al.* (1997). "Determinants of apamin and d-tubocurarine block in SK potassium channels." *J Biol Chem* **272**(37): 23195-200.
- Ishii, T. M., C. Silvia, *et al.* (1997). "A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11651-6.
- IUPAC-IUB, C. (1978). "The nomenclature of lipids (recommendations 1976). IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature." *J Lipid Res* **19**(1): 114-28.
- Jacobson, D., D. Pribnow, *et al.* (2003). "Determinants contributing to estrogen-regulated expression of SK3." *Biochem Biophys Res Commun* **303**(2): 660-8.
- Jacobson, D. A., F. Mendez, *et al.* (2010). "Calcium-activated and voltage-gated potassium channels of the pancreatic islet impart distinct and complementary roles during secretagogue induced electrical responses." *J Physiol* **588**(Pt 18): 3525-37.
- Jager, H., T. Dreker, *et al.* (2004). "Blockage of intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro." *Mol Pharmacol* **65**(3): 630-8.
- Jakobisiak, M., W. Lasek, *et al.* (2003). "Natural mechanisms protecting against cancer." *Immunol Lett* **90**(2-3): 103-22.
- Jensen, B. S., D. Strobaek, *et al.* (1998). "Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel." *Am J Physiol* **275**(3 Pt 1): C848-56.
- Jiang, Y., A. Pico, *et al.* (2001). "Structure of the RCK domain from the E. coli K<sup>+</sup> channel and demonstration of its presence in the human BK channel." *Neuron* **29**(3): 593-601.
- Joiner, W. J., R. Khanna, *et al.* (2001). "Calmodulin regulates assembly and trafficking of SK4/IK1 Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels." *J Biol Chem* **276**(41): 37980-5.
- Joiner, W. J., L. Y. Wang, *et al.* (1997). "hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(20): 11013-8.
- Joober, R., C. Benkelfat, *et al.* (1999). "Lack of association between the hSKCa3 channel gene CAG polymorphism and schizophrenia." *Am J Med Genet* **88**(2): 154-7.
- Kamido, H., H. Eguchi, *et al.* (2002). "Core aldehydes of alkyl glycerophosphocholines in atheroma induce platelet aggregation and inhibit endothelium-dependent arterial relaxation." *J Lipid Res* **43**(1): 158-66.
- Kang, Y., P. M. Siegel, *et al.* (2003). "A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone." *Cancer Cell* **3**(6): 537-49.
- Kao, J. H., P. J. Chen, *et al.* (2010). "Recent advances in the research of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: epidemiologic and molecular biological aspects." *Adv Cancer Res* **108**: 21-72.
- Kapoor, N., R. Bartoszewski, *et al.* (2009). "Knockdown of ASIC1 and epithelial sodium channel subunits inhibits glioblastoma whole cell current and cell migration." *J Biol Chem* **284**(36): 24526-41.
- Kaufman, S., R. J. Pollock, *et al.* (1990). "Dependence of an alkyl glycol-ether monooxygenase activity upon tetrahydropterins." *Biochim Biophys Acta* **1040**(1): 19-27.
- Kaushal, V., P. D. Koeberle, *et al.* (2007). "The Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel KCNN4/KCa3.1 contributes to microglia activation and nitric oxide-dependent neurodegeneration." *J Neurosci* **27**(1): 234-44.

- Keen, J. E., R. Khawaled, *et al.* (1999). "Domains responsible for constitutive and Ca(2+)-dependent interactions between calmodulin and small conductance Ca(2+)-activated potassium channels." *J Neurosci* **19**(20): 8830-8.
- Khaitan, D., U. T. Sankpal, *et al.* (2009). "Role of KCNMA1 gene in breast cancer invasion and metastasis to brain." *BMC Cancer* **9**: 258.
- Khanna, R., M. C. Chang, *et al.* (1999). "hSK4/hIK1, a calmodulin-binding KCa channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation." *J Biol Chem* **274**(21): 14838-49.
- Kim, J. Y., M. K. Kim, *et al.* (2008). "Crystal structure of the leucine zipper domain of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (SK(Ca)) channel from *Rattus norvegicus*." *Proteins* **70**(2): 568-71.
- Kohler, M., B. Hirschberg, *et al.* (1996). "Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain." *Science* **273**(5282): 1709-14.
- Kohler, R., S. Brakemeier, *et al.* (2001). "Impaired hyperpolarization in regenerated endothelium after balloon catheter injury." *Circ Res* **89**(2): 174-9.
- Kohler, R., I. Eichler, *et al.* (2005). "Impaired EDHF-mediated vasodilation and function of endothelial Ca-activated K channels in uremic rats." *Kidney Int* **67**(6): 2280-7.
- Kohler, R., B. P. Kaistha, *et al.* (2010). "Vascular KCa-channels as therapeutic targets in hypertension and restenosis disease." *Expert Opin Ther Targets* **14**(2): 143-55.
- Kohler, R. and P. Ruth (2010). "Endothelial dysfunction and blood pressure alterations in K<sup>+</sup>-channel transgenic mice." *Pflugers Arch* **459**(6): 969-76.
- Kolski-Andreaco, A., H. Tomita, *et al.* (2004). "SK3-1C, a dominant-negative suppressor of SKCa and IKCa channels." *J Biol Chem* **279**(8): 6893-904.
- Koronyo-Hamaoui, M., A. Frisch, *et al.* (2007). "Dual contribution of NR2B subunit of NMDA receptor and SK3 Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel to genetic predisposition to anorexia nervosa." *J Psychiatr Res* **41**(1-2): 160-7.
- Koscielny, S., M. G. Le, *et al.* (1989). "The natural history of human breast cancer. The relationship between involvement of axillary lymph nodes and the initiation of distant metastases." *Br J Cancer* **59**(5): 775-82.
- Krausz, C., G. Gervasi, *et al.* (1994). "Effect of platelet-activating factor on motility and acrosome reaction of human spermatozoa." *Hum Reprod* **9**(3): 471-6.
- Kullmann, D. M. (2010). "Neurological channelopathies." *Annu Rev Neurosci* **33**: 151-72.
- Kupersmidt, S., D. J. Snyders, *et al.* (1998). "A K<sup>+</sup> channel splice variant common in human heart lacks a C-terminal domain required for expression of rapidly activating delayed rectifier current." *J Biol Chem* **273**(42): 27231-5.
- Kurian, M. M., Z. C. Berwick, *et al.* (2011). "Contribution of IKCa channels to the control of coronary blood flow." *Exp Biol Med* (Maywood).
- Kye, M. J., J. Spiess, *et al.* (2007). "Transcriptional regulation of intronic calcium-activated potassium channel SK2 promoters by nuclear factor-kappa B and glucocorticoids." *Mol Cell Biochem* **300**(1-2): 9-17.
- Lallet-Daher, H., M. Roudbaraki, *et al.* (2009). "Intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels (IKCa1) regulate human prostate cancer cell proliferation through a close control of calcium entry." *Oncogene* **28**(15): 1792-806.
- Lamy, C., S. J. Goodchild, *et al.* (2010). "Allosteric block of KCa2 channels by apamin." *J Biol Chem* **285**(35): 27067-77.
- Lauffenburger, D. A. and A. F. Horwitz (1996). "Cell migration: a physically integrated molecular process." *Cell* **84**(3): 359-69.
- Le Guennec, J. Y., H. Ouadid-Ahidouch, *et al.* (2007). "Voltage-gated ion channels, new targets in anti-cancer research." *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **2**(3): 189-202.

- Lee, W. S., T. J. Ngo-Anh, *et al.* (2003). "Small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels and calmodulin: cell surface expression and gating." *J Biol Chem* **278**(28): 25940-6.
- Li, J., Z. Zhou, *et al.* (2007). "Reduction of  $\text{NO}^{-}$  and EDHF-mediated vasodilatation in hypertension: role of asymmetric dimethylarginine." *Clin Exp Hypertens* **29**(7): 489-501.
- Li, W. and R. W. Aldrich (2009). "Activation of the SK potassium channel-calmodulin complex by nanomolar concentrations of terbium." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(4): 1075-80.
- Li, W. and R. W. Aldrich (2011). "Electrostatic influences of charged inner pore residues on the conductance and gating of small conductance  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^{+}$  channels." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Li, W., D. B. Halling, *et al.* (2009). "EF hands at the N-lobe of calmodulin are required for both SK channel gating and stable SK-calmodulin interaction." *J Gen Physiol* **134**(4): 281-93.
- Liegeois, J. F., F. Mercier, *et al.* (2003). "Modulation of small conductance calcium-activated potassium (SK) channels: a new challenge in medicinal chemistry." *Curr Med Chem* **10**(8): 625-47.
- Lin, M. T., R. Lujan, *et al.* (2008). "SK2 channel plasticity contributes to LTP at Schaffer collateral-CA1 synapses." *Nat Neurosci* **11**(2): 170-7.
- Linman, J. W., F. H. Bethell, *et al.* (1958). "The erythropoietic stimulatory activity of batyl alcohol." *J Lab Clin Med* **52**(4): 596-604.
- Linman, J. W., M. J. Long, *et al.* (1959). "Studies on the stimulation of hemopoiesis by batyl alcohol." *J Lab Clin Med* **54**: 335-43.
- Logsdon, N. J., J. Kang, *et al.* (1997). "A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes." *J Biol Chem* **272**(52): 32723-6.
- Lu, L., V. Timofeyev, *et al.* (2009). "Alpha-actinin2 cytoskeletal protein is required for the functional membrane localization of a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel (SK2 channel)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(43): 18402-7.
- Lu, L., Q. Zhang, *et al.* (2007). "Molecular coupling of a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel to L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels via alpha-actinin2." *Circ Res* **100**(1): 112-20.
- Lu, Z. and R. MacKinnon (1994). "Electrostatic tuning of  $\text{Mg}^{2+}$  affinity in an inward-rectifier  $\text{K}^{+}$  channel." *Nature* **371**(6494): 243-6.
- Mackinnon, A. C., M. Tretiakova, *et al.* (2011). "Paxillin expression and amplification in early lung lesions of high-risk patients, lung adenocarcinoma and metastatic disease." *J Clin Pathol* **64**(1): 16-24.
- Maconochie, D. J., J. M. Zempel, *et al.* (1994). "How quickly can GABAA receptors open?" *Neuron* **12**(1): 61-71.
- Maeba, R. and N. Ueta (2003). "Ethanolamine plasmalogens prevent the oxidation of cholesterol by reducing the oxidizability of cholesterol in phospholipid bilayers." *J Lipid Res* **44**(1): 164-71.
- Magistrelli, A., P. Villa, *et al.* (1995). "Fate of 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine (ET18-OME) in malignant cells, normal cells, and isolated and perfused rat liver." *Drug Metab Dispos* **23**(1): 113-8.
- Maher, B. J. and G. L. Westbrook (2005). "SK channel regulation of dendritic excitability and dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb." *J Neurophysiol* **94**(6): 3743-50.
- Maingret, F., B. Coste, *et al.* (2008). "Neurotransmitter modulation of small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels by regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  gating." *Neuron* **59**(3): 439-49.
- Maingret, F., A. J. Patel, *et al.* (2000). "Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated  $\text{K}^{+}$  channels TREK-1 and TRAAK." *J Biol Chem* **275**(14): 10128-33.

- Malins, D. C., J. C. Wekell, *et al.* (1965). "Composition of the Diacyl Glyceryl Ethers and Triglycerides of the Flesh and Liver of the Dogfish (*Squalus Acanthias*).  
J Lipid Res **6**: 100-5.
- Mandel, H., R. Sharf, *et al.* (1998). "Plasmalogen phospholipids are involved in HDL-mediated cholesterol efflux: insights from investigations with plasmalogen-deficient cells." Biochem Biophys Res Commun **250**(2): 369-73.
- Mangold, H. K. and F. Paltauf (1983). ETHER LIPIDS Biochemical and Biomedical Aspects. New York.
- Marigny, K., F. Pedrono, *et al.* (2002). "Modulation of endothelial permeability by 1-O-alkylglycerols." Acta Physiol Scand **176**(4): 263-8.
- Marrion, N. V. and S. J. Tavalin (1998). "Selective activation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by co-localized Ca<sup>2+</sup> channels in hippocampal neurons." Nature **395**(6705): 900-5.
- Martina, M., M. E. Turcotte, *et al.* (2007). "The sigma-1 receptor modulates NMDA receptor synaptic transmission and plasticity via SK channels in rat hippocampus." J Physiol **578**(Pt 1): 143-57.
- Marty, A. (1981). "Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes." Nature **291**(5815): 497-500.
- Matsui, A. and J. T. Williams (2010). "Activation of micro-opioid receptors and block of KIR 3 potassium channels and NMDA receptor conductance by l- and d-methadone in rat locus coeruleus." Br J Pharmacol **161**(6): 1403-13.
- Maylie, J., C. T. Bond, *et al.* (2004). "Small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels and calmodulin." J Physiol **554**(Pt 2): 255-61.
- McCormick, D. A. and D. Contreras (2001). "On the cellular and network bases of epileptic seizures." Annu Rev Physiol **63**: 815-46.
- Means, A. R. and J. R. Dedman (1980). "Calmodulin--an intracellular calcium receptor." Nature **285**(5760): 73-7.
- Micalizzi, D. S., S. M. Farabaugh, *et al.* (2010). "Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression." J Mammary Gland Biol Neoplasia **15**(2): 117-34.
- Mickeleit, M., T. Wieder, *et al.* (1998). "A glucose-containing ether lipid (Glc-PAF) as an antiproliferative analogue of the platelet-activating factor." Angewandte Chemie International Edition **37**(3): 351-353.
- Mickeleit, M., T. Wieder, *et al.* (1995). "Glc-PC, a new type of glucosidic phospholipid." Angewandte Chemie International Edition in English **34**(23-24): 2667-2669.
- Miller, M. J., H. Rauer, *et al.* (2001). "Nuclear localization and dominant-negative suppression by a mutant SKCa3 N-terminal channel fragment identified in a patient with schizophrenia." J Biol Chem **276**(30): 27753-6.
- Milo, G. E. and C. F. Schuler (1992). "Transformation of human epithelial cells." CRC Press.
- Minn, A. J., G. P. Gupta, *et al.* (2005). "Genes that mediate breast cancer metastasis to lung." Nature **436**(7050): 518-24.
- Mitre, R., C. Cheminade, *et al.* (2004). "Oral intake of shark liver oil modifies lipid composition and improves motility and velocity of boar sperm." Theriogenology **62**(8): 1557-66.
- Mitre, R., M. Etienne, *et al.* (2005). "Humoral defence improvement and haematopoiesis stimulation in sows and offspring by oral supply of shark-liver oil to mothers during gestation and lactation." Br J Nutr **94**(5): 753-62.
- Modolell, M., R. Andreesen, *et al.* (1979). "Disturbance of phospholipid metabolism during the selective destruction of tumor cells induced by alkyl-lysophospholipids." Cancer Res **39**(11): 4681-6.

- Mollinedo, F., J. de la Iglesia-Vicente, *et al.* (2010). "In vitro and In vivo selective antitumor activity of Edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts." *Clin Cancer Res* **16**(7): 2046-54.
- Mollinedo, F., J. L. Fernandez-Luna, *et al.* (1997). "Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH<sub>3</sub> (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L)." *Cancer Res* **57**(7): 1320-8.
- Monaghan, A. S., D. C. Benton, *et al.* (2004). "The SK3 subunit of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels interacts with both SK1 and SK2 subunits in a heterologous expression system." *J Biol Chem* **279**(2): 1003-9.
- Monteith, G. R., D. McAndrew, *et al.* (2007). "Calcium and cancer: targeting Ca<sup>2+</sup> transport." *Nat Rev Cancer* **7**(7): 519-30.
- Moolenaar, W. H. and I. Spector (1979). "The calcium current and the activation of a slow potassium conductance in voltage-clamped mouse neuroblastoma cells." *J Physiol* **292**: 307-23.
- Morozevich, G., N. Kozlova, *et al.* (2009). "Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  controls invasion of human breast carcinoma cells by direct and indirect modulation of MMP-2 collagenase activity." *Cell Cycle* **8**(14): 2219-25.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63.
- Muller, P. A., K. H. Vousden, *et al.* (2011). "p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion." *J Cell Biol* **192**(2): 209-18.
- Munn, N. J., E. Arnio, *et al.* (2003). "Deficiency in ethanolamine plasmalogen leads to altered cholesterol transport." *J Lipid Res* **44**(1): 182-92.
- Murthy, S. R., G. Teodorescu, *et al.* (2008). "Identification and characterization of a novel, shorter isoform of the small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel SK2." *J Neurochem* **106**(6): 2312-21.
- Nagan, N. and R. A. Zoeller (2001). "Plasmalogens: biosynthesis and functions." *Prog Lipid Res* **40**(3): 199-229.
- Navin, N., J. Kendall, *et al.* (2011). "Tumour evolution inferred by single-cell sequencing." *Nature* **472**(7341): 90-4.
- Neher, E. and B. Sakmann (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." *Nature* **260**(5554): 799-802.
- Neylon, C. B., C. J. Fowler, *et al.* (2006). "Regulation of the slow afterhyperpolarization in enteric neurons by protein kinase A." *Auton Neurosci* **126-127**: 258-63.
- Neylon, C. B., R. J. Lang, *et al.* (1999). "Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel in vascular smooth muscle: relationship between K(Ca) channel diversity and smooth muscle cell function." *Circ Res* **85**(9): e33-43.
- Ngo-Anh, T. J., B. L. Bloodgood, *et al.* (2005). "SK channels and NMDA receptors form a Ca<sup>2+</sup>-mediated feedback loop in dendritic spines." *Nat Neurosci* **8**(5): 642-9.
- Ngwenya, B. Z. and D. M. Foster (1991). "Enhancement of antibody production by lysophosphatidylcholine and alkylglycerol." *Proc Soc Exp Biol Med* **196**(1): 69-75.
- Nieto, M., J. M. Frade, *et al.* (1997). "Polarization of chemokine receptors to the leading edge during lymphocyte chemotaxis." *J Exp Med* **186**(1): 153-8.
- Nieto-Miguel, T., R. I. Fonteriz, *et al.* (2007). "Endoplasmic reticulum stress in the proapoptotic action of edelfosine in solid tumor cells." *Cancer Res* **67**(21): 10368-78.
- Nilius, B. and W. Wohlrab (1992). "Potassium channels and regulation of proliferation of human melanoma cells." *J Physiol* **445**: 537-48.

- Noble, K., R. Floyd, *et al.* (2010). "Distribution, expression and functional effects of small conductance Ca-activated potassium (SK) channels in rat myometrium." *Cell Calcium* **47**(1): 47-54.
- Nolting, A., T. Ferraro, *et al.* (2007). "An amino acid outside the pore region influences apamin sensitivity in small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels." *J Biol Chem* **282**(6): 3478-86.
- Oliver, D., N. Klocker, *et al.* (2000). "Gating of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels controls fast inhibitory synaptic transmission at auditory outer hair cells." *Neuron* **26**(3): 595-601.
- Ouadid-Ahidouch, H., M. Roudbaraki, *et al.* (2004). "Functional and molecular identification of intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in breast cancer cells: association with cell cycle progression." *Am J Physiol Cell Physiol* **287**(1): C125-34.
- Paget, S. (1989). "International symposium. Critical determinants in cancer progression and metastasis. A centennial celebration of Dr. Stephen Paget's 'seed and soil' hypothesis. March 6-10, 1989, Houston, Texas. Abstracts." *Cancer Metastasis Rev* **8**(2): 93-197.
- Paku, S., B. Dome, *et al.* (2000). "Organ-specificity of the extravasation process: an ultrastructural study." *Clin Exp Metastasis* **18**(6): 481-92.
- Palecek, S. P., J. C. Loftus, *et al.* (1997). "Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness." *Nature* **385**(6616): 537-40.
- Palmer, M. L., K. R. Schiller, *et al.* (2008). "Apical SK potassium channels and Ca<sup>2+</sup>-dependent anion secretion in endometrial epithelial cells." *J Physiol* **586**(3): 717-26.
- Panyi, G., M. Bagdany, *et al.* (2003). "Colocalization and nonrandom distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2592-7.
- Pardo, L. A., D. del Camino, *et al.* (1999). "Oncogenic potential of EAG K(+) channels." *EMBO J* **18**(20): 5540-7.
- Parihar, A. S., M. J. Coghlan, *et al.* (2003). "Effects of intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel modulators on human prostate cancer cell proliferation." *Eur J Pharmacol* **471**(3): 157-64.
- Patel, A. J., M. Lazdunski, *et al.* (2001). "Lipid and mechano-gated 2P domain K(+) channels." *Curr Opin Cell Biol* **13**(4): 422-8.
- Pedarzani, P., J. Mosbacher, *et al.* (2001). "Control of electrical activity in central neurons by modulating the gating of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels." *J Biol Chem* **276**(13): 9762-9.
- Pedarzani, P. and M. Stocker (2008). "Molecular and cellular basis of small--and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain." *Cell Mol Life Sci* **65**(20): 3196-217.
- Pedersen, K. A., R. L. Schroder, *et al.* (1999). "Activation of the human intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel by 1-ethyl-2-benzimidazolinone is strongly Ca(2+)-dependent." *Biochim Biophys Acta* **1420**(1-2): 231-40.
- Pedrono, F., B. Martin, *et al.* (2004). "Natural alkylglycerols restrain growth and metastasis of grafted tumors in mice." *Nutr Cancer* **48**(1): 64-9.
- Pedrono, F., B. Saiag, *et al.* (2007). "1-O-alkylglycerols reduce the stimulating effects of bFGF on endothelial cell proliferation in vitro." *Cancer Lett* **251**(2): 317-22.
- Pena, T. L. and S. G. Rane (1999). "The fibroblast intermediate conductance K(Ca) channel, FIK, as a prototype for the cell growth regulatory function of the IK channel family." *J Membr Biol* **172**(3): 249-57.
- Pennefather, P., B. Lancaster, *et al.* (1985). "Two distinct Ca-dependent K currents in bullfrog sympathetic ganglion cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(9): 3040-4.

- Perkins, W. R., R. B. Dause, *et al.* (1997). "Combination of antitumor ether lipid with lipids of complementary molecular shape reduces its hemolytic activity." *Biochim Biophys Acta* **1327**(1): 61-8.
- Persechini, A. and P. M. Stemmer (2002). "Calmodulin is a limiting factor in the cell." *Trends Cardiovasc Med* **12**(1): 32-7.
- Pfeifer, G. P., M. F. Denissenko, *et al.* (2002). "Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers." *Oncogene* **21**(48): 7435-51.
- Pierce, S. L. and S. K. England (2010). "SK3 channel expression during pregnancy is regulated through estrogen and Sp factor-mediated transcriptional control of the KCNN3 gene." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**(4): E640-6.
- Potier, M., A. Chantome, *et al.* (2011). "The SK3/K(Ca)<sub>2.3</sub> potassium channel is a new cellular target for edelfosine." *Br J Pharmacol* **162**(2): 464-79.
- Potier, M., V. Joulin, *et al.* (2006). "Identification of SK3 channel as a new mediator of breast cancer cell migration." *Mol Cancer Ther* **5**(11): 2946-53.
- Potier, M., T. A. Tran, *et al.* (2010). "Altered SK3/KCa<sub>2.3</sub>-mediated migration in adenomatous polyposis coli (Apc) mutated mouse colon epithelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **397**(1): 42-7.
- Prevarskaya, N., R. Skryma, *et al.* (2010). "Ion channels and the hallmarks of cancer." *Trends Mol Med* **16**(3): 107-21.
- Rajcani, J., N. Asvanyi-Molnar, *et al.* (2010). "Herpesvirus-associated lymphomas: Investigations in humans and animal models." *Acta Microbiol Immunol Hung* **57**(4): 349-76.
- Ren, Y., L. F. Barnwell, *et al.* (2006). "Regulation of surface localization of the small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel, Sk2, through direct phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem* **281**(17): 11769-79.
- Reynolds, A. R., I. R. Hart, *et al.* (2009). "Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors." *Nat Med* **15**(4): 392-400.
- Rhoads, A. R. and F. Friedberg (1997). "Sequence motifs for calmodulin recognition." *FASEB J* **11**(5): 331-40.
- Riethmuller, G. and C. A. Klein (2001). "Early cancer cell dissemination and late metastatic relapse: clinical reflections and biological approaches to the dormancy problem in patients." *Semin Cancer Biol* **11**(4): 307-11.
- Rimini, R., J. M. Rimland, *et al.* (2000). "Quantitative expression analysis of the small conductance calcium-activated potassium channels, SK1, SK2 and SK3, in human brain." *Brain Res Mol Brain Res* **85**(1-2): 218-20.
- Ro, S., W. J. Hatton, *et al.* (2001). "Molecular properties of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels expressed in murine colonic smooth muscle." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**(4): G964-73.
- Robinson, L. J., H. C. Blair, *et al.* (2010). "Regulation of bone turnover by calcium-regulated calcium channels." *Ann N Y Acad Sci* **1192**: 351-7.
- Roger, S., P. Besson, *et al.* (2003). "Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line." *Biochim Biophys Acta* **1616**(2): 107-11.
- Roger, S., M. Potier, *et al.* (2004). "Description and role in proliferation of iberiotoxin-sensitive currents in different human mammary epithelial normal and cancerous cells." *Biochim Biophys Acta* **1667**(2): 190-9.
- Roncarati, R., I. Decimo, *et al.* (2005). "Assembly and trafficking of human small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel SK3 are governed by different molecular domains." *Mol Cell Neurosci* **28**(2): 314-25.
- Ronde, P., G. Giannone, *et al.* (2000). "Mechanism of calcium oscillations in migrating human astrocytoma cells." *Biochim Biophys Acta* **1498**(2-3): 273-80.



- Rosa, A., L. Fananas, *et al.* (2002). "1q21-q22 locus is associated with susceptibility to the reality-distortion syndrome of schizophrenia spectrum disorders." *Am J Med Genet* **114**(5): 516-8.
- Rubel, A., R. Handrick, *et al.* (2006). "The membrane targeted apoptosis modulators erucylphosphocholine and erucylphosphohomocholine increase the radiation response of human glioblastoma cell lines in vitro." *Radiat Oncol* **1**: 6.
- Ruiter, G. A., S. F. Zerp, *et al.* (1999). "Alkyl-lysophospholipids activate the SAPK/JNK pathway and enhance radiation-induced apoptosis." *Cancer Res* **59**(10): 2457-63.
- Sah, P. and E. S. Faber (2002). "Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents." *Prog Neurobiol* **66**(5): 345-53.
- Sahai, E., R. Garcia-Medina, *et al.* (2007). "Smurf1 regulates tumor cell plasticity and motility through degradation of RhoA leading to localized inhibition of contractility." *J Cell Biol* **176**(1): 35-42.
- Sailer, C. A., H. Hu, *et al.* (2002). "Regional differences in distribution and functional expression of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in rat brain." *J Neurosci* **22**(22): 9698-707.
- Sailer, C. A., W. A. Kaufmann, *et al.* (2004). "Comparative immunohistochemical distribution of three small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel subunits, SK1, SK2, and SK3 in mouse brain." *Mol Cell Neurosci* **26**(3): 458-69.
- Saito, Y., W. Sekine, *et al.* (2010). "Potentiation of cell invasion and matrix metalloproteinase production by alpha3beta1 integrin-mediated adhesion of gastric carcinoma cells to laminin-5." *Clin Exp Metastasis* **27**(4): 197-205.
- Salthun-Lassalle, B., E. C. Hirsch, *et al.* (2004). "Rescue of mesencephalic dopaminergic neurons in culture by low-level stimulation of voltage-gated sodium channels." *J Neurosci* **24**(26): 5922-30.
- Schardt, J. A., M. Meyer, *et al.* (2005). "Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer." *Cancer Cell* **8**(3): 227-39.
- Schilling, T., C. Stock, *et al.* (2004). "Functional importance of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels for lysophosphatidic acid-induced microglial migration." *Eur J Neurosci* **19**(6): 1469-74.
- Schmidt, J., K. Friebel, *et al.* (2010). "Migration-associated secretion of melanoma inhibitory activity at the cell rear is supported by KCa3.1 potassium channels." *Cell Res* **20**(11): 1224-38.
- Schmidt-Kittler, O., T. Ragg, *et al.* (2003). "From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13): 7737-42.
- Schumacher, M. A., M. Crum, *et al.* (2004). "Crystal structures of apocalmodulin and an apocalmodulin/SK potassium channel gating domain complex." *Structure* **12**(5): 849-60.
- Schumacher, M. A., A. F. Rivard, *et al.* (2001). "Structure of the gating domain of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel complexed with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin." *Nature* **410**(6832): 1120-4.
- Schwab, A., V. Nechyporuk-Zloy, *et al.* (2011). "Dynamic redistribution of calcium sensitive potassium channels (hK(Ca) 3.1) in migrating cells." *J Cell Physiol*.
- Schwab, A., J. Reinhardt, *et al.* (1999). "K(+) channel-dependent migration of fibroblasts and human melanoma cells." *Cell Physiol Biochem* **9**(3): 126-32.
- Schwab, A., B. Schuricht, *et al.* (1999). "Migration of transformed renal epithelial cells is regulated by K<sup>+</sup> channel modulation of actin cytoskeleton and cell volume." *Pflugers Arch* **438**(3): 330-7.

- Schwab, A., A. Wulf, *et al.* (2006). "Subcellular distribution of calcium-sensitive potassium channels (IK1) in migrating cells." *J Cell Physiol* **206**(1): 86-94.
- Sciaccaluga, M., B. Fioretti, *et al.* (2010). "CXCL12-induced glioblastoma cell migration requires intermediate conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel activity." *Am J Physiol Cell Physiol* **299**(1): C175-84.
- Sen, T., A. Dutta, *et al.* (2010). "Fibronectin induces matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human laryngeal carcinoma cells by involving multiple signaling pathways." *Biochimie* **92**(10): 1422-34.
- Shafer, S. H. and C. L. Williams (2003). "Non-small and small cell lung carcinoma cell lines exhibit cell type-specific sensitivity to edelfosine-induced cell death and different cell line-specific responses to edelfosine treatment." *Int J Oncol* **23**(2): 389-400.
- Shakkottai, V. G., I. Regaya, *et al.* (2001). "Design and characterization of a highly selective peptide inhibitor of the small conductance calcium-activated  $\text{K}^{+}$  channel,  $\text{SkCa}_2$ ." *J Biol Chem* **276**(46): 43145-51.
- Shao, Z., T. O. Makinde, *et al.* (2011). "Calcium-Activated Potassium Channel  $\text{KCa}_{3.1}$  in Lung Dendritic Cell Migration." *Am J Respir Cell Mol Biol*.
- Shi, N., S. Ye, *et al.* (2006). "Atomic structure of a  $\text{Na}^{+}$ - and  $\text{K}^{+}$ -conducting channel." *Nature* **440**(7083): 570-4.
- Shmukler, B. E., C. T. Bond, *et al.* (2001). "Structure and complex transcription pattern of the mouse SK1  $\text{K}(\text{Ca})$  channel gene,  $\text{KCNN1}$ ." *Biochim Biophys Acta* **1518**(1-2): 36-46.
- Simpson, C. D., K. Anyiwe, *et al.* (2008). "Anoikis resistance and tumor metastasis." *Cancer Lett* **272**(2): 177-85.
- Skryma, R. N., N. B. Prevarskaya, *et al.* (1997). "Potassium conductance in the androgen-sensitive prostate cancer cell line, LNCaP: involvement in cell proliferation." *Prostate* **33**(2): 112-22.
- Slaton, J. W., J. A. Hampton, *et al.* (1994). "Exposure to alkyllysophospholipids inhibits in vitro invasion of transitional cell carcinoma." *J Urol* **152**(5 Pt 1): 1594-8.
- Smilenov, L. B., A. Mikhailov, *et al.* (1999). "Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts." *Science* **286**(5442): 1172-4.
- Smith, P., N. P. Rhodes, *et al.* (1998). "Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells." *FEBS Lett* **423**(1): 19-24.
- Soh, H. and C. S. Park (2001). "Inwardly rectifying current-voltage relationship of small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels rendered by intracellular divalent cation blockade." *Biophys J* **80**(5): 2207-15.
- Soh, H. and C. S. Park (2002). "Localization of divalent cation-binding site in the pore of a small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel and its role in determining current-voltage relationship." *Biophys J* **83**(5): 2528-38.
- Soule, H. D., T. M. Maloney, *et al.* (1990). "Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10." *Cancer Res* **50**(18): 6075-86.
- Srivastava, S., P. Choudhury, *et al.* (2006). "Phosphatidylinositol 3-phosphate indirectly activates  $\text{KCa}_{3.1}$  via 14 amino acids in the carboxy terminus of  $\text{KCa}_{3.1}$ ." *Mol Biol Cell* **17**(1): 146-54.
- Srivastava, S., Z. Li, *et al.* (2006). "Histidine phosphorylation of the potassium channel  $\text{KCa}_{3.1}$  by nucleoside diphosphate kinase B is required for activation of  $\text{KCa}_{3.1}$  and CD4 T cells." *Mol Cell* **24**(5): 665-75.
- Srivastava, S., Z. Li, *et al.* (2005). "The phosphatidylinositol 3-phosphate phosphatase myotubularin-related protein 6 (MTMR6) is a negative regulator of the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel  $\text{KCa}_{3.1}$ ." *Mol Cell Biol* **25**(9): 3630-8.

- Srivastava, S., O. Zhdanova, *et al.* (2008). "Protein histidine phosphatase 1 negatively regulates CD4 T cells by inhibiting the K<sup>+</sup> channel KCa3.1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(38): 14442-6.
- Stackman, R. W., R. S. Hammond, *et al.* (2002). "Small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels modulate synaptic plasticity and memory encoding." *J Neurosci* **22**(23): 10163-71.
- Stafforini, D. M., T. M. McIntyre, *et al.* (2003). "Platelet-activating factor, a pleiotrophic mediator of physiological and pathological processes." *Crit Rev Clin Lab Sci* **40**(6): 643-72.
- Stocker, M. and P. Pedarzani (2000). "Differential distribution of three Ca(2+)-activated K(+) channel subunits, SK1, SK2, and SK3, in the adult rat central nervous system." *Mol Cell Neurosci* **15**(5): 476-93.
- Strassmaier, T., C. T. Bond, *et al.* (2005). "A novel isoform of SK2 assembles with other SK subunits in mouse brain." *J Biol Chem* **280**(22): 21231-6.
- Strobaek, D., C. Hougaard, *et al.* (2006). "Inhibitory gating modulation of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by the synthetic compound (R)-N-(benzimidazol-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphtylamine (NS8593) reduces afterhyperpolarizing current in hippocampal CA1 neurons." *Mol Pharmacol* **70**(5): 1771-82.
- Strobaek, D., T. D. Jorgensen, *et al.* (2000). "Pharmacological characterization of small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels stably expressed in HEK 293 cells." *Br J Pharmacol* **129**(5): 991-9.
- Strobaek, D., L. Teuber, *et al.* (2004). "Activation of human IK and SK Ca<sup>2+</sup> -activated K<sup>+</sup> channels by NS309 (6,7-dichloro-1H-indole-2,3-dione 3-oxime)." *Biochim Biophys Acta* **1665**(1-2): 1-5.
- Sun, G., H. Tomita, *et al.* (2001). "Genomic organization and promoter analysis of human KCNN3 gene." *J Hum Genet* **46**(8): 463-70.
- Suyama, K., I. Shapiro, *et al.* (2002). "A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor." *Cancer Cell* **2**(4): 301-14.
- Syme, C. A., A. C. Gerlach, *et al.* (2000). "Pharmacological activation of cloned intermediate- and small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels." *Am J Physiol Cell Physiol* **278**(3): C570-81.
- Syme, C. A., K. L. Hamilton, *et al.* (2003). "Trafficking of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, hIK1, is dependent upon a C-terminal leucine zipper." *J Biol Chem* **278**(10): 8476-86.
- Taguchi, H. and W. L. Armarego (1998). "Glyceryl-ether monooxygenase [EC 1.14.16.5]. A microsomal enzyme of ether lipid metabolism." *Med Res Rev* **18**(1): 43-89.
- Tajima, N., K. Schonherr, *et al.* (2006). "Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human melanoma cells are up-regulated by hypoxia involving hypoxia-inducible factor-1alpha and the von Hippel-Lindau protein." *J Physiol* **571**(Pt 2): 349-59.
- Tamarina, N. A., Y. Wang, *et al.* (2003). "Small-conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channels are expressed in pancreatic islets and regulate glucose responses." *Diabetes* **52**(8): 2000-6.
- Taylor, M. S., A. D. Bonev, *et al.* (2003). "Altered expression of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure." *Circ Res* **93**(2): 124-31.
- Thorneloe, K. S., A. M. Knorn, *et al.* (2008). "Small-conductance, Ca(2+) -activated K<sup>+</sup> channel 2 is the key functional component of SK channels in mouse urinary bladder." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**(5): R1737-43.
- Tomita, H., V. G. Shakkottai, *et al.* (2003). "Novel truncated isoform of SK3 potassium channel is a potent dominant-negative regulator of SK currents: implications in schizophrenia." *Mol Psychiatry* **8**(5): 524-35, 460.

- Trinh, N. T., A. Prive, *et al.* (2008). "EGF and K<sup>+</sup> channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **295**(5): L866-80.
- Tronchere, H., F. Terce, *et al.* (1991). "Modulation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase translocation by oleic acid and the antitumoral alkylphospholipid in HL-60 cells." *Biochem Biophys Res Commun* **176**(1): 157-65.
- Tse, A. and B. Hille (1992). "GnRH-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations and rhythmic hyperpolarizations of pituitary gonadotropes." *Science* **255**(5043): 462-4.
- Tsuruo, T. and N. Fujita (2008). "Platelet aggregation in the formation of tumor metastasis." *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **84**(6): 189-98.
- Tu, L., V. Santarelli, *et al.* (1996). "Voltage-gated K<sup>+</sup> channels contain multiple intersubunit association sites." *J Biol Chem* **271**(31): 18904-11.
- Tucker, G. C. (2006). "Integrins: molecular targets in cancer therapy." *Curr Oncol Rep* **8**(2): 96-103.
- Tuteja, D., S. Rafizadeh, *et al.* (2010). "Cardiac small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel subunits form heteromultimers via the coiled-coil domains in the C termini of the channels." *Circ Res* **107**(7): 851-9.
- Tuteja, D., D. Xu, *et al.* (2005). "Differential expression of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels SK1, SK2, and SK3 in mouse atrial and ventricular myocytes." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**(6): H2714-23.
- Urakami-Harasawa, L., H. Shimokawa, *et al.* (1997). "Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries." *J Clin Invest* **100**(11): 2793-9.
- Ureche, O. N., R. Baltaev, *et al.* (2008). "Novel insights into the structural basis of pH-sensitivity in inward rectifier K<sup>+</sup> channels Kir2.3." *Cell Physiol Biochem* **21**(5-6): 347-56.
- Valeyev, N. V., A. K. Downing, *et al.* (2006). "A calcium dependent de-adhesion mechanism regulates the direction and rate of cell migration: a mathematical model." *In Silico Biol* **6**(6): 545-72.
- van Blitterswijk, W. J. and M. Verheij (2008). "Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects." *Curr Pharm Des* **14**(21): 2061-74.
- Venkatasubramanian, J., M. Ao, *et al.* (2010). "Ion transport in the small intestine." *Curr Opin Gastroenterol* **26**(2): 123-8.
- Verkhovsky, A. B., T. M. Svitkina, *et al.* (1999). "Self-polarization and directional motility of cytoplasm." *Curr Biol* **9**(1): 11-20.
- Vogalis, F., J. R. Harvey, *et al.* (2002). "Regulation of K<sup>+</sup> channels underlying the slow afterhyperpolarization in enteric afterhyperpolarization-generating myenteric neurons: role of calcium and phosphorylation." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **29**(10): 935-43.
- Vogler, W. R. (1994). "Bone marrow purging in acute leukemia with alkyl-lysophospholipids: a new family of anticancer drugs." *Leuk Lymphoma* **13**(1-2): 53-60.
- Vogler, W. R., W. E. Berdel, *et al.* (1996). "A phase II trial of autologous bone marrow transplantation (ABMT) in acute leukemia with edelfosine purged bone marrow." *Adv Exp Med Biol* **416**: 389-96.
- Vogler, W. R., J. Liu, *et al.* (1998). "The anticancer drug edelfosine is a potent inhibitor of neovascularization in vivo." *Cancer Invest* **16**(8): 549-53.
- Wagner, E. J., O. K. Ronnekleiv, *et al.* (2001). "The noradrenergic inhibition of an apamin-sensitive, small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in hypothalamic gamma-aminobutyric acid neurons: pharmacology, estrogen sensitivity, and relevance to the control of the reproductive axis." *J Pharmacol Exp Ther* **299**(1): 21-30.

- Walter, J. T., K. Alvina, *et al.* (2006). "Decreases in the precision of Purkinje cell pacemaking cause cerebellar dysfunction and ataxia." *Nat Neurosci* **9**(3): 389-97.
- Wanders, R. J. and H. R. Waterham (2006). "Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited." *Annu Rev Biochem* **75**: 295-332.
- Wang, Z. H., B. Shen, *et al.* (2007). "Blockage of intermediate-conductance-Ca(2+) -activated K(+) channels inhibits progression of human endometrial cancer." *Oncogene* **26**(35): 5107-14.
- Warth, R., K. Hamm, *et al.* (1999). "Molecular and functional characterization of the small Ca(2+)-regulated K<sup>+</sup> channel (rSK4) of colonic crypts." *Pflugers Arch* **438**(4): 437-44.
- Wathes, D. C., D. R. Abayasekara, *et al.* (2007). "Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction." *Biol Reprod* **77**(2): 190-201.
- Weaver, A. K., V. C. Bomben, *et al.* (2006). "Expression and function of calcium-activated potassium channels in human glioma cells." *Glia* **54**(3): 223-33.
- Weskamp, M., W. Seidl, *et al.* (2000). "Characterization of the increase in [Ca(2+)]<sub>i</sub> during hypotonic shock and the involvement of Ca(2+)-activated K(+) channels in the regulatory volume decrease in human osteoblast-like cells." *J Membr Biol* **178**(1): 11-20.
- Wissmann, R., W. Bildl, *et al.* (2002). "A helical region in the C terminus of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels controls assembly with apo-calmodulin." *J Biol Chem* **277**(6): 4558-64.
- Wittekindt, O. H., V. Visan, *et al.* (2004). "An apamin- and scyllatoxin-insensitive isoform of the human SK3 channel." *Mol Pharmacol* **65**(3): 788-801.
- Wolf, K., I. Mazo, *et al.* (2003). "Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis." *J Cell Biol* **160**(2): 267-77.
- Wolfe, S. E., V. J. Schmidt, *et al.* (2009). "Prominent role of KCa3.1 in endothelium-derived hyperpolarizing factor-type dilations and conducted responses in the microcirculation in vivo." *Cardiovasc Res* **82**(3): 476-83.
- Wong, C. H., B. Heit, *et al.* (2010). "Molecular regulators of leucocyte chemotaxis during inflammation." *Cardiovasc Res* **86**(2): 183-91.
- Wulff, H., G. A. Gutman, *et al.* (2001). "Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa1." *J Biol Chem* **276**(34): 32040-5.
- Wulff, H., A. Kolski-Andreaco, *et al.* (2007). "Modulators of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels and their therapeutic indications." *Curr Med Chem* **14**(13): 1437-57.
- Wulff, H., M. J. Miller, *et al.* (2000). "Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, IKCa1: a potential immunosuppressant." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14): 8151-6.
- Wulff, H. and B. S. Zhorov (2008). "K<sup>+</sup> channel modulators for the treatment of neurological disorders and autoimmune diseases." *Chem Rev* **108**(5): 1744-73.
- Xia, X. M., B. Fakler, *et al.* (1998). "Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels." *Nature* **395**(6701): 503-7.
- Xu, B., J. Mao, *et al.* (2010). "CIC-3 chloride channels are essential for cell proliferation and cell cycle progression in nasopharyngeal carcinoma cells." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **42**(6): 370-80.
- Xu, Y., D. Tuteja, *et al.* (2003). "Molecular identification and functional roles of a Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel in human and mouse hearts." *J Biol Chem* **278**(49): 49085-94.

- Yamamoto, N., D. A. St Claire, Jr., *et al.* (1988). "Activation of mouse macrophages by alkylglycerols, inflammation products of cancerous tissues." *Cancer Res* **48**(21): 6044-9.
- Yamazaki, D., S. Kurisu, *et al.* (2009). "Involvement of Rac and Rho signaling in cancer cell motility in 3D substrates." *Oncogene* **28**(13): 1570-83.
- Yilmaz, M. and G. Christofori (2010). "Mechanisms of motility in metastasizing cells." *Mol Cancer Res* **8**(5): 629-42.
- Yu, F. H., V. Yarov-Yarovoy, *et al.* (2005). "Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily." *Pharmacol Rev* **57**(4): 387-95.
- Yuan, J., G. X. Shi, *et al.* (2008). "Calmodulin bound to stress fibers but not microtubules involves regulation of cell morphology and motility." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(2): 284-93.
- Zhang, B. M., V. Kohli, *et al.* (2001). "Calmodulin binding to the C-terminus of the small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel hSK1 is affected by alternative splicing." *Biochemistry* **40**(10): 3189-95.
- Zhang, M., K. Houamed, *et al.* (2005). "Pharmacological properties and functional role of K<sub>slow</sub> current in mouse pancreatic beta-cells: SK channels contribute to K<sub>slow</sub> tail current and modulate insulin secretion." *J Gen Physiol* **126**(4): 353-63.
- Zhao, T., W. H. Xia, *et al.* (2008). "Surgical excision promotes tumor growth and metastasis by promoting expression of MMP-9 and VEGF in a breast cancer model." *Exp Oncol* **30**(1): 60-4.
- Zheng, B., K. Oishi, *et al.* (1990). "Inhibition of protein kinase C, (sodium plus potassium)-activated adenosine triphosphatase, and sodium pump by synthetic phospholipid analogues." *Cancer Res* **50**(10): 3025-31.
- Zhou, X., X. Lu, *et al.* (1992). "The relationship between cellular ether glycerophospholipid content and sensitivity of cancer cells to 1-O-octadecyl-2-O-methyl-glycerophosphocholine." *Anticancer Res* **12**(5): 1659-62.
- Zhou, X., X. Lu, *et al.* (1996). "1-O-octadecyl-2-O-methyl-glycerophosphocholine inhibits the transduction of growth signals via the MAPK cascade in cultured MCF-7 cells." *J Clin Invest* **98**(4): 937-44.
- Zoeller, R. A., A. C. Lake, *et al.* (1999). "Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether." *Biochem J* **338** ( Pt 3): 769-76.
- Zoeller, R. A., O. H. Morand, *et al.* (1988). "A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing." *J Biol Chem* **263**(23): 11590-6.



# Alban Girault

## Inhibition du canal SK3 et du développement de métastases par un éther-lipide synthétique



### Résumé

Il a été mis en évidence que le canal SK3 est un médiateur de la migration de cellules cancéreuses mammaires, une propriété essentielle à la formation de métastases. Par ailleurs, ce canal est inhibé par l'édelfosine, un éther-lipide ayant des propriétés anti-tumorales *in vitro* mais son usage en clinique a été abandonné en raison d'effets secondaires.

Une première partie de ce travail a permis de déterminer les parties de l'édelfosine nécessaires à l'inhibition du canal SK3 et de la migration cellulaire. Ceci nous a permis de sélectionner l'Ohmline (1-O-Hexadécyl-2-O-Méthyl-*sn*-glycéro-lactose), un analogue non toxique de l'édelfosine qui conserve son activité inhibitrice de SK3 et de la migration. Dans un deuxième temps, nous avons testé ce lipide dans un modèle murin de développement tumoral et nous avons montré qu'il réduisait le développement des métastases sans modifier la tumeur primaire.

En conclusion, nous avons décrit l'Ohmline qui est le premier inhibiteur lipidique de SK3 et qui pourrait devenir le premier membre d'une famille de composés lipidiques inhibiteurs de la formation de métastases.

Mots-clés : éther-lipides, canal SK3, cellules cancéreuses mammaires, migration cellulaire, métastases.

### Résumé en anglais

It has been shown that SK3 channel was a mediator of breast cancer cells migration, a fundamental property for metastasis formation. In addition, edelfosine inhibits SK3 channel. This ether-lipid owns a high anti cancerous potential *in vitro* but its clinical use was hampered by some side effects.

Firstly, we showed the structural parts of edelfosine required for SK3 channel inhibition and cell motility inhibition. Moreover, we selected Ohmline (1-O-Hexadécyl-2-O-Méthyl-*sn*-glycéro-lactose), an edelfosine's analogue that preserves SK3 channel and motility inhibitory properties. Secondly, we evaluated this lipid on tumor development in nude mice model. We showed that this lipid reduces metastasis formation without effect on primary tumor.

To conclude, we described Ohmline, the first lipid inhibitor of SK3. This compound should become the first member of a new family of metastasis lipid inhibitors.

Key-words: ether-lipid, SK3 channel, breast cancer cells, cell motility, metastasis.